

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-508626

⑬ 公表 平成5年(1993)12月2日

⑭ Int. Cl. <sup>5</sup> A 61 K 31/70 9/127 47/18	識別記号 ADY L B	庁内整理番号 8314-4C 7329-4C 7433-4C※	審査請求 未請求 予備審査請求 有	部門(区分) 3(2)
---	-----------------------	--	----------------------	-------------

(全 34 頁)

⑮ 発明の名称 生物学的活性分子の細胞内配達のための陽イオン脂質

⑯ 特 願 平3-508835

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)10月16日

⑱ 出 願 平3(1991)4月18日

⑲ 国際出願 PCT/US91/02691

⑳ 国際公開番号 WO91/16024

㉑ 国際公開日 平3(1991)10月31日

優先権主張 ㉒ 1990年4月19日 ㉓ 米国(US) ㉔ 511.219

⑳ 発 明 者 フェルグナー、フィリップ・エ アメリカ合衆国、92067 カリフォルニア州、ランチョ・サンタ・フエ、ラス・パロマス、5412

㉑ 出 願 人 バイカル・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、92121 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、タウン・センター・ドライブ、9373

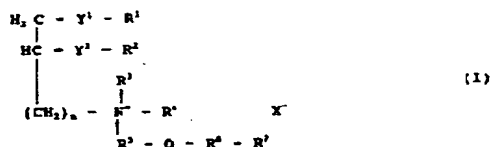
㉒ 代 理 人 弁理士 深見 久郎 外4名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

# 請求の範囲

1. 以下の構造



を有する組成物であって、

Y<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> は、同一または異なり、かつ -O-CH<sub>2</sub>-、-O-C(O)-、または -O- であり、

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、同一または異なり、かつ H、または C<sub>1</sub>、ないし C<sub>22</sub> アルキルもしくはアルケニルであり、

R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup> は、同一または異なり、かつ C<sub>1</sub>、ないし C<sub>24</sub> アルキルまたは H であり、

R<sup>5</sup> は、C<sub>1</sub>、ないし C<sub>24</sub> のアルキル直鎖または分枝鎖であり、

R<sup>6</sup> は、-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-、アルキル、アリルもしくはアラリルであるジアミノカルボン酸、または前記ジアミノカルボン酸に連結された -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH-、または欠けており、

R<sup>7</sup> は、H、スベルミン、スベルミジン、ヒストンもしくは DNA 結合特異性を有する蛋白質、またはこれらと同一の基で R<sup>7</sup> 部のアミンが R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup> または R<sup>10</sup> 基で四級

化された基であり、または

R<sup>7</sup> は、側鎖上の正に荷電された基を有する L-または D-アルファアミノ酸であり、前記アミノ酸はアルギニン、ヒスチジン、リシンもしくはオルニチンまたはそれらの類似体を含み、または、そこにおいて、R<sup>7</sup> 部のアミンは R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup> または R<sup>10</sup> 基で四級化され、または

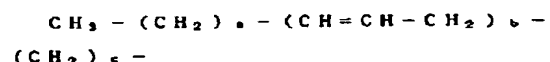
R<sup>7</sup> は、L-または D-アルファアミノ酸からなるグループから選択されるポリペプチドであり、アミノ酸残基の少なくとも1つはアルギニン、ヒスチジン、リシン、オルニチン、またはその類似体を含み、

n は 1 ないし 8 であり、

m は 1 ないし 18 であり、さらに

X は非毒性アニオンである、組成物。

2. R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup> は個々に C<sub>1</sub>、ないし C<sub>22</sub> アルキル基であり、R<sup>5</sup> は -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- であり、R<sup>6</sup> は欠けており、R<sup>7</sup> は H であり、さらに R<sup>1</sup> および R<sub>2</sub> は、個々に 0 ないし 6 の不飽和部位を有し、かつ以下の構造



を有し、a および c の和は 1 ないし 23 であり、かつ b は 0 ないし 6 である、請求項 1 に記載の組成物。

3. Y<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> は類似であり、かつ -O-C(O)- である、請求項 2 に記載の組成物。

4. DL-1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアミノ

プロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムおよびその塩類である、請求項3に記載の組成物。

5.  $Y^1$  および  $Y^2$  は類似であり、かつ  $-O-CH_2-$  である、請求項2に記載の組成物。

6. 1, 2- $O$ -ジオレイル-3-ジメチアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムおよびその塩類である、請求項5に記載の組成物。

7.  $Y^1$  および  $Y^2$  は異なり、かつ  $-O-CH_2-$  または  $-O-C(O)-$  のいずれかである、請求項2に記載の組成物。

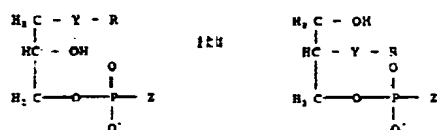
8. 1- $O$ -オレイル-2-オレオイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムおよびその塩類である、請求項7に記載の組成物。

9. 3, 5-( $N, N$ -ジリシル)-ジアミノベンゾイル-3-(DL-1, 2-ジオレオイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)。

10. 3, 5-( $N, N$ -ジリシル)-ジアミノベンゾイルグリシル-3-(DL-1, 2-ジオレオイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)。

11. L-スベルミン-5-カルボキシル-3-(DL-1, 2-ジオレオイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)。

12. 以下の構造またはその光学異性体



を有し、

$Y$  は  $-O-CH_2-$  および  $-O-C(O)-$  からなるグループから選択され、

$R$  は  $C_1$ 、ないし  $C_{23}$  アルキルまたはアルケニルであり、さらに

$Z$  は頭基である、製剤。

14. 細胞へのポリヌクレオチドおよびペプチドのトランスフェクションのための製剤であって、クレーム1および9ないし13のいずれか1つに述べられた構造とともに、効果的なトランスフェクションを促進する量のリゾホスファチドを有する化合物を含む、製剤。

15. 前記リゾホスファチドは中性の頭基である、請求項14に記載の製剤。

16. 前記リゾホスファチドはリゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンからなるグループから選択される、請求項15に記載の製剤。

17. 前記リゾホスファチドはリゾホスファチジルコリンである、請求項16に記載の製剤。



を有する組成物であり、

$Y^1$  および  $Y^2$  は、異なり、かつ  $-O-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-$  または  $-O-$  のいずれかであり、

$R^1$  および  $R^2$  は、個々に  $C_1$ 、ないし  $C_{23}$  アルキルもしくはアルケニルまたは  $H$  であり、

$R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  は、同一または異なり、かつ  $H$ 、 $C_1$ 、ないし  $C_{10}$  アルキル、 $C_7$ 、ないし  $C_{11}$  アリルもしくはアルカリル、または  $R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  のうちの少なくとも2つが一緒にされてキヌクリジノ (quinolidino)、ピペリジノ (piperidino)、ピロリジノ (pyrrolidino)、またはモルホリノ (morpholino) を形成し、

$n$  は1ないし22であり、さらに

$X$  は非毒性アニオンである、組成物。

13. 細胞へのポリヌクレオチドのトランスフェクションのための製剤であって、陽イオン脂質および効果的なトランスフェクションを促進する量のリゾホスファチドを含み、以下の構造

18. 前記リゾホスファチドはモノオレオイルリゾホスファチジルコリンである、請求項17に記載の製剤。

19. 前記リゾホスファチドは負に電荷された頭基を有する、請求項14に記載の製剤。

20. 前記リゾホスファチドの陽イオン脂質に対するモル比は約0.50より小さい、請求項14に記載の製剤。

21. 前記陽イオン脂質はDOTMA、DOTAP、および請求項1および9ないし13のいずれか1つに述べられた構造を有する化合物からなるグループから選択される、請求項14に記載の製剤。

22. ポリヌクレオチドおよびペプチドの細胞へのトランスフェクションのための脂質製剤であって、DOTMA、DOTAPならびに請求項1および9ないし13の化合物のいずれか1つからなるグループから選択される陽イオン脂質または複数の陽イオン脂質の組合わせを含み、総陽イオン脂質の最大3分の1までの、効果的なトランスフェクションを促進する量の前記陽イオン脂質は、請求項1および9ないし13の構造の  $Y^1$  および  $R^1$ 、または  $Y^2$  および  $R^2$ 、またはそれに対応するDOTMAもしくはDOTAPの部分にヒドロキシル基である種から選択される、脂質製剤。

23. 請求項1ないし12のいずれか1つに記載の構造を有する陽イオン脂質、または前記陽イオン脂質種の混合物を含むリポソーム製剤であって、前記脂質または脂質の

混合物は水性媒質において小滴の形状である、リポソーム製剤。

24. ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、またはコレステロールからなるグループから選択される中性脂質種をさらに含む、請求項23に記載のリポソーム製剤。

25. 前記陽イオン脂質種の前記中性脂質種に対するモル比は約9/1から1/9である、請求項24に記載のリポソーム製剤。

26. 前記モル比は約5/5である、請求項25に記載のリポソーム製剤。

27. リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、または陽イオン脂質種のリゾ系からなるグループから選択されるリゾ脂質をさらに含む、請求項23に記載のリポソーム製剤。

28. 請求項1および9ないし13のいずれか1つに記載の構造を有する陽イオン脂質とともに、製薬的に効果的な量の治療剤を含む、製薬生産物。

29. 前記治療剤はコルチコステロイドまたは非ステロイド系抗炎症剤である、請求項28に記載の製薬生産物。

30. 前記治療剤は治療的に効果的なヌクレオチド類似体またはヌクレオチド類似体である、請求項28に記載の製薬生産物。

31. 前記治療剤は前記類似体のホスファチジル誘導体

またはジホスフェートジグリセリド誘導体である、請求項30に記載の製薬生産物。

32. 前記類似体はジデオキシヌクレオシド、ジデヒドロヌクレオシド、ヌクレオシドのハロゲン化もしくはアジド誘導体、または非環式ヌクレオシドである、請求項31に記載の製薬生産物。

33. 前記類似体は3'-アジド-2', 3'-ジデオキシビリミジン、3'-ハロビリミジンジデオキシヌクレオシド、または2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシヌクレオシドからなるグループから選択される抗ウイルス性ヌクレオシドである、請求項22に記載の製薬生産物。

34. 前記類似体は3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)である抗ウイルス性ヌクレオシドである、請求項31に記載の製薬生産物。

35. 前記類似体はアシクロビル、ガンシクロビル、1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードシトシン(FIAC)または1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル(FIAU)からなるグループから選択される抗ウイルス性ヌクレオシドである、請求項31に記載の製薬生産物。

36. 治療ポリヌクレオチドを含む、請求項28に記載の製薬生産物。

37. 前記治療ポリヌクレオチドはリボザイムまたはアンチセンスRNAもしくはDNAである、請求項36に記載の製薬生産物。

38. 前記リボザイムまたはアンチセンスDNAもしくはRNAはHIVに抗して向けられる、請求項37に記載の製薬調製物。

39. 前記リボザイムまたはアンチセンスDNAもしくはRNAはrevトランスアクチベータに抗して向けられる、請求項38に記載の製薬調製物。

40. 前記治療ポリヌクレオチドは28-merホスホロチオエートアンチセンスポリヌクレオチドである、請求項39に記載の製薬調製物。

41. 前記治療ポリヌクレオチドは治療ポリペプチドをコードする、請求項36に記載の製薬調製物。

42. 前記治療ポリペプチドは病気の状態で不足しているかまたは欠けている、請求項41に記載の製薬調製物。

43. 前記治療ポリペプチドは天然ホルモンまたはその合成類似体である、請求項41に記載の製薬調製物。

44. 前記治療ポリペプチドは免疫原である、請求項41に記載の製薬調製物。

45. 前記治療剤は蛋白質またはペプチドである、請求項41に記載の製薬調製物。

46. 請求項1および9ないし13のいずれか1つに記載の構造を有する化合物、および製薬的に受け入れ可能な

賦形剤中の製薬的に有効な量の治療剤を含む局所的用途のための製薬調製物。

47. 前記治療剤はコルチコステロイド、非ステロイド系抗炎症剤、抗生物質、抗真菌剤、酸化剤または抗ウイルス性ヌクレオシドである、請求項46に記載の製薬調製物。

48. 前記治療剤は蛋白質、ポリペプチドまたは治療ポリヌクレオチドである、請求項46に記載の製薬調製物。

49. リボザイムまたはアンチセンスRNAもしくはDNA配列である治療ポリヌクレオチドを含む、請求項48に記載の製薬調製物。

50. 病気の状態で不足しているかまたは欠けている遺伝子産物をコードする治療ポリヌクレオチドを含む、請求項48に記載の製薬調製物。

51. 免疫原ペプチド、天然ホルモンまたは天然ホルモンの合成類似体をコードする治療ポリヌクレオチドを含む、請求項48に記載の製薬調製物。

52. 単純ヘルペスの治療における局所的用途のための製薬調製物であって、請求項1および9ないし13のいずれか1つに記載の構造を有する化合物とともに、製薬的に受け入れ可能な賦形剤中の製薬的に効果的な濃度のアシクロビル、ガンシクロビル、1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードシトシン(FIAC)または1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨ-

ドウラシル (F I A U) を含む、製薬調製物。

53. 生物学的活性剤を植物または動物の細胞に導入するための方法であって、

a. 請求項1および9ないし13のいずれか1つに記載の構造を有し、かつ前記生物学的活性剤を含む陽イオン脂質を含む脂質小囊を調製するステップと、

b. 前記小囊で前記細胞に接触するステップとを含む、前記生物学的活性剤は前記細胞内に摂取される、方法。

54. 生物学的活性剤を植物または動物の細胞に導入するための方法であって、

請求項1および9ないし13のいずれか1つに記載の構造を有する陽イオン脂質を含む脂質小囊を調製するステップと、

前記脂質小囊が存在する場合に生物活性剤で前記細胞に接触するステップとを含む、前記生物活性剤は前記細胞内に摂取される、方法。

55. 前記接触するステップは生体外で発生する、請求項54に記載の方法。

56. 脊椎動物の病気を治療する方法であって、

請求項1および9ないし13のいずれか1つに記載の構造を有する陽イオン脂質と、製薬的に効果的な量の前記病気の治療に特異な治療剤とを含む製薬調製物を投与し、かつ前記治療剤が前記脊椎動物の少なくとも1つの細胞に到達されることを可能にするステップとを含む、それによ

って前記病気が効果的に治療される、方法。

57. 前記調製物の前記脊椎動物細胞への生体外での投与を含む、その細胞はそれから前記脊椎動物に戻される、請求項56に記載の方法。

58. 前記調製物の皮膚または粘膜表面への局所的適用を含む、請求項56に記載の方法。

59. 前記脊椎動物の体腔または組織への前記調製物の注射を含む、請求項56に記載の方法。

60. 前記調製物の経口投与を含む、請求項56に記載の方法。

61. 前記生物学的活性剤はポリヌクレオチドである、請求項56に記載の方法。

62. 前記生物学的活性剤はポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAであり、前記ポリペプチドは前記DNAまたは前記mRNAが前記細胞に摂取された後発現される、請求項56に記載の方法。

63. 前記生物学的活性剤は薬剤である、請求項56に記載の方法。

#### 明 細 書 生物学的活性分子の

#### 細胞内配達のための陽イオン脂質

#### 発明の背景

この発明は生物学的活性剤、特にポリヌクレオチド、蛋白質、ペプチド、および薬剤分子の配達を、膜内外輸送を容易にすることによって、または生物学的表面への接着を促進することによって高めるために使用される陽イオン脂質に関する。この発明は特にアンモニウム基を含む陽イオン脂質に関する。

いくつかの生物活性物質はその生物学的効果を及ぼすために細胞に入る必要はない、なぜならそれらは細胞表面レセプタを介して細胞表面に作用すること、または細胞外成分に相互作用することのいずれかによって動作するからである。しかしながら、蛋白質およびポリヌクレオチドを含む天然の生物学的分子およびその類似体、または細胞より小さいかもしくは分子のレベルで細胞機能に影響を及ぼすことが可能である薬剤のような外来物質は、その効果を生じるために好ましくは細胞内に到達される。これらの薬剤にとって、細胞膜はそれらに対して不浸透性の選択的バリアを与える。

ちょうど細胞のプラズマ膜が細胞への潜在的に毒性の物質のランダムな導入を防ぐ選択的バリアであるように、ヒトの体は全生体に類似の防護機能を果たす保護膜によって取囲まれる。これらの膜は皮膚、胃の粘膜、鼻の粘膜など

を含む。これらの膜は毒性物質の侵入を防ぐ保護機能を果たす一方で、潜在的に有益な治療物質の体内への通過をも妨げ得る。細胞膜の複合組成物は、内因性および外因性蛋白質とともに、リン脂質、糖脂質、およびコレステロールを含み、その機能は $Ca^{++}$  および他の金属イオン、陰イオン、ATP、細毛、微小管、酵素ならびに $Ca^{++}$  結合蛋白質を含む細胞質成分によって影響を及ぼされる。構造的および細胞質細胞成分の間の相互作用ならびにその外部信号への応答は、細胞型内およびそれらの間で示される膜選択性の原因である輸送プロセスを構成する。

細胞によって自然に摂取されない薬剤の成功した細胞内配達には、細胞内膜融合の自然プロセスを利用することによって、またはエンドサイトーシスおよび飲細胞運動を含む細胞の自然輸送メカニズムの直接アクセスによって達成された (ダズグーンズ、エヌ、(Dargatzis, N.)、「サブセルラー・バイオケミストリー」 (Subcellular Biochemistry) 11: 195-286 (1985年))。

膜バリアは第1に、複合体中のこれらの物質を天然細胞膜の脂質組成物に非常に類似した脂質製剤に関連付けることによって克服され得る。これらの脂質は接触すると細胞膜と融合することが可能であり、かつこのプロセスにおいて、関連のある物質は細胞内で配達される。脂質複合体は細胞膜と融合することによるだけでなく、細胞膜と押入られるべき分子との間の電荷反発を克服することによって

も細胞内輸送を容易にすることが可能である。製剤の脂質は細胞膜のリン脂質のような両親媒性脂質を含み、かつ水性系で中空の脂質小囊またはリポソームを形成する。この特性はリポソーム内に配達されるべき物質を取込むために使用可能であり、他の応用では、興味ある薬剤分子は中空の水性内部に取込まれるよりはむしろ、内因性膜成分として脂質小囊に組込まれることが可能である。

有益なまたは興味ある蛋白質の細胞内配達は、発現可能なDNAおよびmRNAを哺乳類の細胞に導入することによって達成可能であり、これはトランスフェクションと呼ばれる有用な技術である。このように導入された遺伝子配列は内生的な蛋白質合成酵素を使用することによって遺伝子によってコードされる対応する蛋白質を発生することが可能である。多くの病気の治療は、標的細胞の内部に留まることが可能であり、標的細胞の局所環境に分泌され、またはその効果を生じるために体循環に分泌され得るペプチドの誘発された細胞内生産によって高められ得る。

生物活性ペプチドのDNAまたはmRNA先駆体を細胞内に導入するための様々な技術は、細胞膜を貫通する固有の能力を有する、ベクターおよびレトロウィルスの組換えを含む、ウィルスベクターの使用を含む。しかしながら、外因性DNAを細胞の染色体材料に組込むためにかかるウィルス剤を使用することはゲノムへの損傷の危険を伴い、かつ悪性のトランスフォーメーションを誘発する可能性を

伴う。生体内でのその使用を制限するこのアプローチの他の局面は、これらの方法によって達成されるDNAのゲノムへの統合はそれがコードするペプチドの発現に対する制御の喪失を意味し、その結果一時的な治療を達成することが困難であり、かつ治療の潜在的な望まれない副作用を後退させるかまたは停止することが困難または不可能であるかもしれない。

リポソームは可能性のある生体内配達賦形剤として論じられ、かつDNAの細胞内発現へのこのアプローチを使用するいくつかの有望な結果が得られた（マニノ、アール・ジェイ（Manino, R. J.）「フールド・フォゲライト、エス（Fould-Fogelitt, S.）、「バイオテクニクス6」（Bio techniques 6）、682-690（1988年）、イタニ、ティー（Itani, T.）、アリガ、エイチ（Arita, H.）、ヤマグチ、エタ（Yamaguchi, E.）、タダクマ、ティー（Tadokuma, T.）&ヤスダ、ティー（Yasuda, T.）、「遺伝子56」（Gene 56）、267-276（1987年）、ニコラウ、シー（Nicola, C.）、レグラント、エイ（Legrand, A.）&グロウス、ジー・イー（Grosse, G. E.）、Meth. Enz. 149、157-176（1987年）、ストラウビンガー、アール・エム（Strasburger, R. M.）&パバハジヨポウラス、ディー（Papahadjopoulos, D.）、Meth. Enz. 101、512-527（1983年）、ワーニング、シー・ワイ（Waring, C. F.）&ハワーン、エル

（Huang, L.）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 7851-7855（1987年）が、しかしながら、その方法論は基本的な問題を有する。困難な点の主なものは、リポソームが標的細胞表面と融合できずに、食細胞的に摂取されることである。食作用されたリポソームはリソソーム区画に配達され、そこでポリヌクレオチドは消化酵素の作用にさらされ、劣化され、低効率の発現につながる。

この分野の大きな前進は、リポソームの形状、つまり小さな小囊における正に荷電された合成陽イオン脂質、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）が、自発的にDNAと相互作用して組織培養細胞の細胞膜の負に荷電された脂質と融合することが可能な脂質-DNA複合体を形成することが可能であり、結果としてDNAの摂取および発現の双方をもたらすという発見であった（フェルグナー、ピー・エル（Ferguson, P. L.）他のProc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 7413-7417（1987年）およびエプスタイン、ディー（Epstein, D.）他の米国特許第4,891,355号）。他はリン脂質との組合わせでDOTMA類似体、1,2-ビス（オレオイルオキシ）-3-（トリメチルアンモニオ）プロパン（DOTAP）をうまく使用して、DNA-複合化小囊を形成した。高度に陽イオン性のポリヌクレオチドを生きている組織培養細胞に配達するための有効な賦形剤である登録商標リポフェクテ

ン（Lipofectin）試薬（ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ（Bethesda Research Laboratories）、ゲイゼルズバーグ（Gaithersburg）、メリーランド（Maryland））は、複合体を形成するために、負に荷電されたポリヌクレオチドと自発的に相互作用する正に荷電されたDOTMAリポソームを含む。十分に正に荷電されたリポソームが使用された場合、結果として生じる複合体の正味の電荷もまた正である。このように調製された正に荷電された複合体は負に荷電された細胞表面に自発的に付着し、プラズマ膜と融合し、かつ機能しうるポリヌクレオチドを、たとえば組織培養細胞に効率的に配達する。

既知の陽イオン脂質の使用は生体外でのポリヌクレオチド配達のための従来のリポソーム技術に関連する多くの問題を克服するが、生体外および生体内応用の双方に関連するいくつかの問題が残る。まず、陽イオン脂質媒介配達効率の他の方法に比べて比較的高いが、生産される遺伝子生産物の絶対レベルは典型的に平均細胞当たりわずか数百転写である。このように、有用な方法論を達成するために10ないし1000倍のファクタで配達および発現を改良できれば望ましいであろう。第2に、DOTMAのような既知の陽イオン脂質は組織培養細胞に有毒であるので、ゆえに生体外毒性を低減する何らかの改良があればこの方法論を強化するであろう。

非常に多くの情報が高分子の細胞への配達のための他の

陽イオン脂質の使用に関連して現われている。ロイター (Loyter) は感染し得るタバコモザイクウィルスを植物プロトプラストに転移することが可能な四級アンモニウム界面活性剤を含む小囊を調製した。(バラス, エタ (Ballas, E.), ザカイ, エタ (Zakai, E.), セラ, アイ (Sela, I.) およびロイター, エイ (Loyter, A.), Biochim. Biophys. Acta **939** 8-18 (1988年))。ハワーングはマウスの線維芽細胞にトランスフェクトされたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子から機能し得る発現を得るために、セチルトリメチルアンモニウムブロミドを使用した(ピナドウエイジ, ビー (Pinadovage, P.), シュミット, エル (Schmitt, E.) およびハワーング, エル, Biochim. Biophys. Acta **985** 33-37 (1989年))。ベイヤ (Behr) はスベルミンの新規の脂質組和性誘導体は一次下体細胞をトランスフェクトすることが可能であることを示した(ベイヤ, ジェイ・ピー (Behr, J-P), デメネイクス, ビー (Demeneix, B.), レフラ, ジェイ・ピー (Lefrère, J-P) およびベレズームトゥル, ジェイ (Peters-Mutal, J.), Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** 6982-6986 (1989年))。最後に、ジョン・シルビアス (John Silivius) はエイブル (Eibl) (エイブル, エイチ (Eibl, E.) およびウリイ, ビー (Wulley, P.) Biophys. Chem. **10** 261-271 (1979年)) によって最初に

または現在の市販のスタンダードであるリポフェクションのようなジェーテル脂質は、不十分に代謝されるエーテル結合のために体に蓄積することが予期される。そして最後にこの陽イオン脂質トランスフェクション法は血清によって抑制されることが報告されており、生体内応用のために、100%血清のような複合的な生物学的環境でトランスフェクションを生じさせる条件が明らかにされる必要がある。

したがって、説明されたトランスフェクションの既知のリポフェクション技術は以前に知られた方法より効率的でありかつ満足のいくものであり、一時的であるとともに安定したトランスフェクションおよびペプチド発現を可能にするが、何の因子がトランスフェクションプロセスの効率を制御し、かつどのようにそれが最適化され得るかは理解されていない。上述の系の利点を有するが、その固有の制限を有しない細胞内配達系を発展させるためにこれらの因子を決定することは望ましいであろう。

したがって、この発明の目的はDNAおよびmRNAのようなポリヌクレオチドの細胞への安定かつ一時的なトランスフェクションをより効果的に実行する陽イオン脂質を提供することである。

この発明の目的はまた蛋白質、ペプチドおよび小さな有機分子を含む治療的な興味のある他の分子を細胞により効果的に配達する陽イオン脂質を提供することである。

合成された陽イオン脂質(DOTAP)は、負に荷電されたリポソームと融合することが可能であり、かつ機能し得るDNAおよびRNAを組織培養細胞に配達することが可能なりポソームを形成することを示した(スタマティス, エル (Stamatatos, E.), レベンティス, アール (Leventis, E.), ズーカマン, エム・ジェイ (Zuckerman, E.J.) & シルビアス, ジェイ・アール (Silivius, J.), 「バイオケミストリ」 **27** (1988年) 3917-3925 (1988年))。他の研究所は合成陽イオン両親媒性化合物から形成される小囊の物理的特性を研究した(ルーバート, エル・エイ・エム (Rupert, E. A. M.), ヘクストラ, ディー (Heckstra, D.), およびエンゲベルツ, ジェイ・ピー・エフ・エヌ (Engelberts, J. B. F. M.) Acc. Chem. Res. **108** 2628-2631 (1985年); カルモナ・リベロ, エイ・エム (Carmona-Libero, A. M.), ヨシダ, エル・エス (Yoshida, E. S.) およびチャイモビッチ, エイチ (Chaimovich, E.), J. Phys. Chem. **89** 2928-2933 (1985年); ルーバート, エル・エイ・エム, エンゲベルツ, ジェイ・ピー・エフ・エヌおよびヘクストラ, ディー, J. Amer. Chem. Soc. **108** 3920-3925 (1986年))。

生体外トランスフェクション技術を直接生体内応用に拡張することは実行可能ではない。生体内では、DOTMA

さらに、この発明の目的は細胞内配達を達成する際により効果的であるだけでなく、低減された生体内および生体外毒性を有するように代謝可能でもある陽イオン脂質を提供することである。

この発明の他の目的は生体内および生体外トランスフェクション双方において最適に効果的な、新規の陽イオン脂質を含むトランスフェクション製剤を提供することである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、脂質複合体形成に際して、後に起こるRNAトランスフェクションに対する血清存在の影響を示すデータを要約する。

図2は血清のRNAトランスフェクションの有効性に対する影響を示す。

図3は陽イオン脂質濃度の、陽イオン脂質としてDOTAPおよびDOTMAを使用するRNAトランスフェクションの有効性に対する影響を示す。

図4は中性脂質の、RNAトランスフェクションを促進する際の一定の陽イオン脂質の比較有効性に対する影響を示す。

図5はRNAトランスフェクションにおけるDOTMA、DOTMAおよびローゼンタール抑制因子(Rosenthal is inhibitor)の対応する誘導体の比較有効性を示す。

図6a-図6dは脂質製剤におけるリゾホスファチジルコリンの相対的濃度の上昇の、細胞培養における遺伝子生

産物の発現によって示されるようなDNAトランスフェクション効率に対する影響を示す。

図7a-図7cは様々な陽イオン脂質類似体の比較DNAトランスフェクション活性を示す。

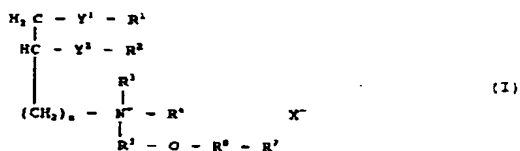
図8a-図8dはトランスフェクション脂質製剤における中性リン脂質の、DNAトランスフェクションの効率に対する影響を示す。

図9a-図9cはトランスフェクション脂質製剤のコレステロールの、DNAトランスフェクションの効率に対する影響を示す。

#### 発明の概要

この発明は生体内および生体外応用の双方における、かつ植物および動物の細胞への、ポリヌクレオチド、蛋白質、小さな有機分子および薬剤を含む生物活性剤の細胞内配達で使用するのに適当な新規の陽イオン脂質の組成物を提供する。

これらの組成物は次の一般構造を有し、



ここでY<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> は同一または異なり、かつ-O-CH<sub>2</sub>-、-O-C(O)-、または-O-であり、

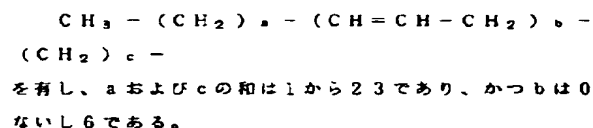
の化合物はエーテル結合されたアルキル基を有し、トランスフェクション特性において現在既知の陽イオン脂質より優れていることが発見された。このクラスの化合物の具体的な例は、1, 2-O-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムおよびその塩類である。細胞内配達のための有用な陽イオン脂質はまたY<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> が異なりかつ-O-CH<sub>2</sub>-かまたは-O-C(O)-のいずれかである化合物を含む。これらの化合物は、エーテルおよびエステル結合の双方によって付加されたアルキル基を有し、低い毒性および改良されたトランスフェクション特性の組合わされた特性を有するであろう。このクラスの特に好ましい組成物は、1-O-オレイル-2-オレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムおよびその塩類である。

この発明によって提供される付加的な新規の陽イオン脂質は、β-ヒドロキシエタノールアミン部のヒドロキシルで付加された付加的な陽イオン基を含む一般構造の付加物である。このクラスの化合物の好ましい実施例において、付加的な陽イオン基はジアミノカルボン酸リンカーを介してヒドロキシル基に付加されたリシル基によって与えられる。グリシルスペースはリンカーをヒドロキシル基に接続させ得る。このクラスの特に好ましい組成物は、3, 5-(N, N-ジリシル)-ジアミノベンゾイル-3-(DL-1, 2-ジオレイル-ジメチルアミノプロピル-β-

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は同一または異なり、かつH、またはC<sub>1</sub>ないしC<sub>23</sub>アルキルもしくはアルケニルであり、さらに

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> および R<sup>7</sup> は以下に規定されるとおりである。

好ましい実施例は、組成物であって、R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup> が個々にC<sub>1</sub>ないしC<sub>23</sub>アルキル基であり、R<sup>5</sup> が-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-であり、R<sup>6</sup> が欠けており、R<sup>7</sup> がHであり、かつR<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が0から6の不飽和部位を個々に有し、かつ以下の構造



特に好ましい実施例は長鎖アルキル基が脂肪酸である、つまりY<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> が類似でありかつ-O-C(O)-である組成物である。これらの化合物は細胞によって容易に代謝され、かつゆえに現在既知のトランスフェクション剤の毒性がない。

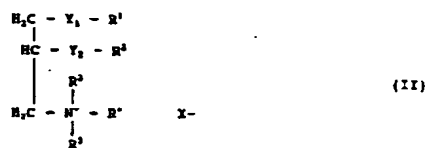
このクラスの化合物の具体的な例は、DL-1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムおよびその塩類である。

他の特に好ましい実施例はY<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> が類似でありかつ-O-CH<sub>2</sub>-であるそれらの化合物である。これら

ヒドロキシエチルアミン)、および3, 5-(N, N-ジリシル)-ジアミノベンゾイル-グリシル-3-(DL-1, 2-ジオレイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)である。

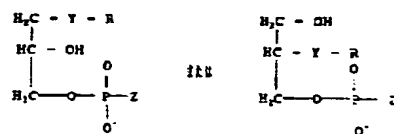
代替的に、付加物の付加的な陽イオン基はたとえばスベルミン、スベルミジン、ヒストン、またはDNAを結合することが知られている他の分子のような陽イオン性のアミンを含有する基を付加することによって与えられ得る。このクラスの組成物の好ましい実施例は、L-スベルミン-5-カルボキシル-3-(DL-1, 2-ジオレイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)である。これらの陽イオン基はひいては付加されたリシン、スベルミン、または他のアミン含有基上のアルキル四級化基を介して陽イオン脂質組成物にさらに疎水性領域を与え得る。

この発明の範囲内にやはり含まれるのは、その構造のアルキル置換基とグリセロール部との間のエーテル結合と置換されるエステル結合を有する既知の陽イオン脂質の類似体であり、生体内での使用に適した毒性の少ないより容易に代謝される組成物を与える。これらの類似体は以下の一般構造を有し、



またはその光学異性体を有し、  
 $\text{Y}^1$  および  $\text{Y}^2$  は異なり、かつ  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$  または  $-\text{O}-$  のいずれかであり、  
 $\text{R}^1$  および  $\text{R}^2$  は個々に  $\text{C}_1$ 、ないし  $\text{C}_{23}$  アルキルもしくはアルケニルまたは  $\text{H}$  であり、さらに  
 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$  および  $\text{X}$  は以下に規定されるとおりである。

この発明のさらに他の局面に従って、陽イオン脂質および効果的なトランスフェクションを促進する量のリゾホスファチドを含むトランスフェクションのための脂質製剤が提供され、それは以下の構造を有し



$\text{Y}$  は  $-\text{O}-\text{CH}_2-$  および  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$  からなるグループから選択され、

の製剤における陽イオン対中性脂質種の好ましいモル比は、約  $9/1$  から  $1/9$  であり、約  $5/5$  のモル比は特に好ましい。リポソーム製剤はリゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、または陽イオン脂質種のリゾ形からなるグループから選択されるリゾ脂質をさらに含む。

この発明のさらに他の局面に従って、薬理学的に効果的な量の治療剤とともにここに開示された構造のいずれかを有するこの発明の陽イオン脂質を含む製薬生産物が提供される。これらの組成物に存在する陽イオン脂質は活性治療剤の細胞内配達を容易にする。局所使用、腸内使用および腸管外使用のための生産物が与えられる。1つの製薬生産物において、治療剤はステロイドであり、他においては、治療剤は非ステロイド系抗炎症剤である。

この発明の他の製薬生産物において、治療剤は抗ウィルス性ヌクレオシド類似体または好ましくは抗ウィルス性ヌクレオシド類似体の脂質誘導体であり、それはホスファチジル誘導体、またはジホスフェートジグリセリド誘導体である。抗ウィルス性ヌクレオシドはジデオキシヌクレオシド、ジデオキシリボヌクレオシド、ヌクレオシドのハロゲン化もしくはアジド誘導体、または非環式ヌクレオシドであり得る。好ましい実施例において、抗ウィルス性ヌクレオシドの脂質誘導体は、 $(3' - \text{アジド} - 3' - \text{デオキシ})$  チミジン  $-5' - \text{ジホスホ} - 3' - \text{ジアルシルグリセロール}$  (A

$\text{R}$  は  $\text{C}_1$ 、ないし  $\text{C}_{23}$  アルキルもしくはアルケニルであり、さらに

$\text{Z}$  は頭基である。

ポリヌクレオチドおよびペプチドの細胞へのトランスフェクションのための好ましい製剤は、効果的なトランスフェクションを促進する量のリゾホスファチドとともにここに述べられた構造を有するこの発明の新規の陽イオン化合物を含む。リゾホスファチドは中性のまたは負の頭基を有してもよい。リゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンは好ましく、かつ1-オレオイルリゾホスファチジルコリンは特に好ましい。リゾホスファチド脂質は、陽イオン性脂質に対するリゾ脂質のモル比  $0.5$  で製剤に有利に存在する。

この発明の新規の陽イオン脂質から選択された陽イオン脂質のリゾ形、DOTMAまたはDOTAPもまたトランスフェクションの有効性を増大するために使用され得る。これらのリゾ形は製剤の総陽イオン脂質の約3分の1までの効果的な量で有利に存在する。

この発明の他の局面に従って、この発明の陽イオン脂質を含むリポソーム製剤が提供され、陽イオン脂質は水性媒質において小囊の形状である。リポソーム製剤の脂質はホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、またはコレステロールからなるグループから選択された中性脂質種をさらに含む得る。これら

2Tジホスフェートジグリセリド)、およびジデオキシチミジンジホスフェートジグリセリドである。特に好ましい実施例において、抗ウィルス性ヌクレオシドの脂質誘導体は、アシクロビルもしくはガンシクロビルのジホスフェートジグリセリドまたは1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードシトシン(FIAC)もしくは1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル(FIAU)のジホスフェートジグリセリド誘導体である。

この発明の他の製薬生産物において、治療剤はポリヌクレオチドである。これらの実施例の1つにおいて、治療ポリヌクレオチドはリボザイムまたはアンチセンスRNAもしくはDNAである。好ましい実施例において、製剤はアンチセンスDNAもしくはRNAまたはHIVに抗して向けられるリボザイムを含む。特に好ましい実施例において、治療ポリヌクレオチドはアンチセンスDNAもしくはRNAまたはHIVのreverseトランスクリプターに抗して向けられるリボザイムである。かかる剤の一例は28-me rホスホロチオエート(phosphorothioate)アンチセンスポリヌクレオチドである。代替的に、治療ポリヌクレオチドは免疫原、天然ホルモンまたは天然ホルモンの合成類似体をコードするものであってもよいし、または病気の状態で不足したかまたは欠けた遺伝子生産物をコードするポリ

ヌクレオチド配列であってもよく、前記遺伝子生産物に関連する治療の必要があるヒトへの前記生産物の投与は治療効果を有する。

開示された製薬生産物はまた上記の治療ポリヌクレオチドによってコードされたものに対応する治療蛋白質またはポリペプチドを含んでもよい。

好ましい実施例において、この発明は、製薬的に許容される試剤中の薬理的に効果的な量の治療剤とともにここに開示された構造のいずれかを有するこの発明の新規の陽イオン脂質を含む局所用途のための製薬調製物を提供する。好ましい治療剤はステロイド、非ステロイド系抗炎症剤、抗ウィルス性ヌクレオシドまたはこれらの抗ウィルス性ヌクレオシドのリン脂質誘導体、リボザイムまたはアンチセンスRNAもしくはDNA配列である治療ポリヌクレオチド、治療蛋白質もしくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または治療蛋白質もしくはポリペプチドそれ自体である。治療蛋白質またはポリペプチドはたとえば遺伝病、免疫原、天然ホルモンまたは天然ホルモンの合成類似体に欠けているかまたはないものであってもよい。

この発明のこの局面に従う特に好ましい実施例の中に含まれるものは単純ヘルペスの治療のための局所製剤であり、製薬的に許容される試剤中の薬理的に効果的な濃度のアシクロビル、ガンシクロビル、1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-

ヨードシトシン (FIA C) または 1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル (FIA U) とともにこの発明の陽イオン脂質を含む。好ましい実施例において、この調製物はアシクロビル、ガンシクロビル、FIA C または FIA U のホスホグリセリド誘導体を含む。

この発明の他の局面に従って、植物または動物いずれかの細胞に生物学的活性剤を導入するための方法が提供され、この方法はこの発明の陽イオン脂質を含む脂質小囊を調製するステップと、生物活性剤の細胞へのトランスフェクションまたは輸送を容易にするためにこれらの脂質小囊を使用するステップとを含む。細胞内輸送は、生物活性剤を脂質小囊に組込むかまたは被包し、かつ従来のリポソーム方法のように細胞を脂質小囊に接触することによって、または代替的に、従来のトランスフェクション方法に従って生物活性剤とともに陽イオン脂質を含む、空の脂質小囊に細胞を同時に接触することによって達成され得る。どちらの戦略のプロセスにおいても、生物活性剤は細胞によって摂取される。この方法の好ましい実施例において、生物活性剤は蛋白質、ポリヌクレオチド、抗ウィルス性ヌクレオシドまたは薬剤である。特に好ましい実施例において、生物活性剤はアンチセンスRNAもしくはDNA配列またはリボザイムである。この方法の一実施例に従って、接触するステップは生体外で発生する。この方法は脊椎動物の病氣

の治療に適用可能であり、脊椎動物に対する病氣の治療に特異的な薬理的に効果的な量の治療剤とともに、上に述べられた構造を有する陽イオン脂質の任意の1つを含み、かつ治療剤が細胞に組込まれることを可能にする製薬調製物を投与するステップを含み、それによってその病氣は効果的に治療される。生物活性剤は生体内または生体外で動物の細胞に配達される。生物活性剤の生体外配達は動物から取り除かれた細胞上で実行され得る。細胞は動物の体に戻され、それによってその動物は治療される。

この発明の他の実施例に従う方法は調製物の皮膚への局所適用、調製物の体腔へもしくは前記脊椎動物の組織への注射、または前記調製物の経口投与を含む。生物学的活性剤はポリペプチドをコードする、たとえば、DNAまたはmRNAのようなポリヌクレオチドであることが可能であり、前記ポリペプチドは前記DNAまたは前記mRNAが前記細胞に摂取された後発現される。さらに他の実施例において、生物学的活性剤は薬剤である。

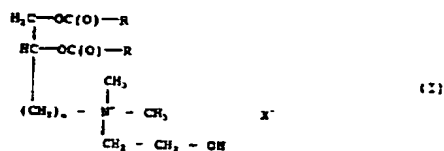
この発明の陽イオン脂質はこの目的のために現在利用可能な薬剤の使用より効果的な細胞内配達を提供する。さらにこれらの脂質は生体内および生体外処置で使用された場合細胞により毒性のない種を含む。

この発明のこれらのおよび他の利点および特徴は以下の説明および添付の請求の範囲からより完全に明らかになるであろう。

#### 発明の詳細な説明

疎水性アルキル基とともにアンモニウム基を有する組成物を含むこの発明の陽イオン脂質 (CL) およびこれらの陽イオン脂質の付加物は、トランスフェクション処置で使用されるべき脂質小囊またはリポソームを調製するために、または蛋白質、ポリペプチド、小さな有機分子および治療興味のある薬剤の細胞内配達を同様に容易にするために製剤で有利に使用される。付加物は細胞膜と相互作用する際に脂質の有効性を高める付加的な陽イオンおよび疎水性基をさらに含む。

以下の構造



を有し、Rは長鎖脂肪酸である化合物のある誘導体および付加物が、トランスフェクションおよび他の細胞内配達法のための脂質製剤で使用するための非常に効果的な化合物であることを本発明者らは発見した。C<sub>18</sub> (ステアロイル) 脂肪酸を含むこの型の化合物の単一の種は、ローゼンタール、エイ・エフ (Rosenthal, A. F.) およびアール・ビー・ガイア (B. P. Geier) によって、*J. Biol. Chem.* **235** (8): 2202-2206 (1960年) に記

載された。ホスホリパーゼAの抑制因子（ローゼンタール抑制因子、R I）であるローゼンタール化合物は、それ自体はトランスフェクションまたは細胞内配達のプロモータとして効果はない。トランスフェクション特性を与える際に非常に効果的であると本発明者らが発見したR I分子への修正は、好ましい長鎖脂肪酸基の置換、R Iのグリセロール部と脂肪酸基との間の好ましいアシル（エステル）またはアルキル（エーテル）結合の選択、および細胞膜との相互作用を促進するヒドロキシル部への基の付加である。これらの化合物は欧州特許出願第0187 702号（1986年）で説明された陽イオン脂質を含むいずれの現在既知のものよりトランスフェクション能力において優れていることが証明された。

#### 命名法

説明を単純にするために、ここで以下のような頭文字によって化合物を称することにする。

R I：ローゼンタール抑制因子

DOR I：2つのC<sub>18</sub>不飽和（18：1）脂肪酸基を有するR Iのジオレイル誘導体であって、

DOR Iジエステル：DL-1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウム

DOR Iジエーテル：DL-1, 2-O-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチル

またはエステル/エーテル：DOR Iのリシン含有付加物であって、グリシルスベサによってDOR Iに隨意に結合されるジアミノ安息香酸リンカーによってβ-ヒドロキシエチル部のヒドロキシル基に付加されるリシン基を有する。

DLYS-DABA-DPR Iジエステル、ジエーテルまたはエステル/エーテル：上述のDOR I化合物の類似体であるが、DPR Iを含む。

SPC-DOR Iジエステル、ジエーテル、またはエステル/エーテル：DOR Iのスベルミン含有付加物であって、β-ヒドロキシエチル部のヒドロキシル基に付加されたスベルミンを有する。

SPC-DPR Iジエステル、ジエーテル、またはエステル/エーテル：上述のDOR I化合物の類似体であるが、DPR Iを含む。

SPC-DABA-DOR Iジエステル、ジエーテル、またはエステル/エーテル：DOR Iのスベルミン含有付加物であって、グリシルスベサによってDOR Iに隨意に結合されるジアミノ安息香酸リンカーによってβ-ヒドロキシエチル部のヒドロキシル基に付加されるスベルミン基を有する。

この発明の一局面に従う陽イオン脂質は以下の一般公式

アンモニウム

DOR Iエステル/エーテル：DL-1-O-オレイル-2-オレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウム

または

DL-1-オレイル-2-O-オレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウム

を含む。

DPR I：C<sub>18</sub>（16：0）脂肪酸基を有するR Iの誘導体であって、

DPR Iジエステル：DL1, 2-ジパルミトイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウム

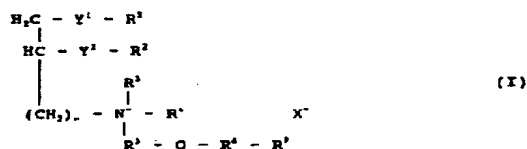
DPR Iジエーテル：DL1, 2-O-ジパルミチル-3-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアンモニウムを含む。

DOTMA：N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウム

DOTAP：DL-1, 2-ジオレイル-3-プロピル-N, N, N-トリメチルアンモニウム

DPTMA：DL-(2, 3-ジパルミチル)-3-プロピル-N, N, N-トリメチルアンモニウム

DLYS-DABA-DOR Iジエステル、ジエーテル



を有し、

Y<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> は同一または異なり、かつ-O-CH<sub>2</sub>-、-O-C(O)-、または-O-であり、

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は同一または異なり、かつH、またはC<sub>1</sub>、ないしC<sub>23</sub>アルキルもしくはアルケニルであり、

R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup> は同一または異なり、かつC<sub>1</sub>、ないしC<sub>24</sub>アルキルまたはHであり、

R<sup>5</sup> はC<sub>1</sub>、ないしC<sub>24</sub>アルキル直鎖または分岐鎖であり、

R<sup>6</sup> は-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-、アルキル、アリールもしくはアラルキルであるジアミノカルボン酸、または前記ジアミノカルボン酸に結合された-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-であるか、または欠けているかである。

R<sup>7</sup> はH、スベルミン、スベルミジン、ヒストン、またはDNA結合特異性を有する蛋白質であり、R<sup>7</sup>部のアミンはR<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、またはR<sup>6</sup>基で四級化されるか、またはR<sup>7</sup>は側鎖上で正に荷電された基を有するし-またはD

ーアルファアミノ酸であり、かかるアミノ酸はアルギニン、ヒスチジン、リシンまたはオルニチンまたはそれらの類似体を含み、またはこれらと同一のアミノ酸においてR<sup>7</sup>部のアミンはR<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>またはR<sup>5</sup>基で四級化されるか、または

R<sup>7</sup>はL-またはD-アルファアミノ酸を含むグループから選択されるポリペプチドであり、そこにおいてアミノ酸残基の少なくとも1つはアルギニン、ヒスチジン、リシン、オルニチンまたはそれらの類似体を含み、

nは1ないし8であり、

mは1ないし18であり、さらに

Xは非毒性のアニオンである。

本発明者らは四級アンモニウム基を有する陽イオン脂質のクラス内の構造-トランスフェクション活性関係を決定し、かつこれらの関係は効率的なトランスフェクションを予言する際に有用であることを発見した。本発明者らはしたがってトランスフェクション製剤で使用するのに適したこのクラスの合成陽イオン脂質を提供する。エーテル結合を含む長鎖脂肪族(R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>)基を有するCLはエステル結合を有するものより好まれ、不飽和R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>基を有するCLは対応する飽和基を有するCLより好まれ、かつ四級アンモニウム基上の極性のヒドロキエチル基の置換基を有するR<sup>1</sup>の類似体のようなCLは、アルキル基、たとえばDOTMAのメチル置換基と置換されたも

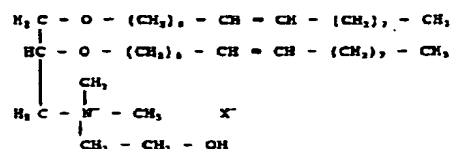
さらに他の好ましい実施例において、この発明の陽イオン脂質は細胞膜への結合を高めるように作用する様々な種とエタノールアミン部のヒドロキシル基で置換される。好ましい実施例において、エタノールアミンのアミン基は四級化される。

この目的のための好ましい種はスベルミンおよびスベルミジンなどのような化合物、または多重アミノ基を有する他の化合物、またはヒストン、またはアルギニンおよびヒスチジンのような塩基性アミノ酸が豊富な類似の蛋白質である。ヒストン、スベルミン、およびスベルミジンのような陽イオン物質は、負に荷電された細胞膜表面を結合しかつ調整することが知られている。たとえば、脂質誘導のスベルミン状の構造は哺乳類の内分泌細胞への遺伝子転送を効率的に調整することが報告されている(ベイヤ、ジェイ・ビー他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6982-6986 (1989年))。本発明者らはアミノ酸およびスベルミンに由来する陽イオン脂質および陽イオン構造の双方の有利な特性を組合わせる一連の分子を設計した。これらの分子はカルボン酸基によって、DOR I、DOR I EまたはDPR Iのような脂質のエタノールアミン基のヒドロキシル部にスベルミンを結合することによって調整される。

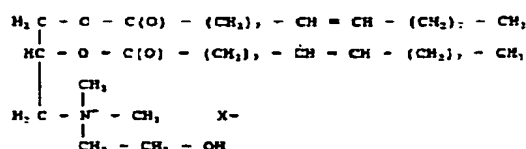
化合物の1つのかかる系列はL-スベルミン-5-カルボキシル-3-(DL-1, 2-ジバロミトイル-ジメチ

ルのより効果的である。

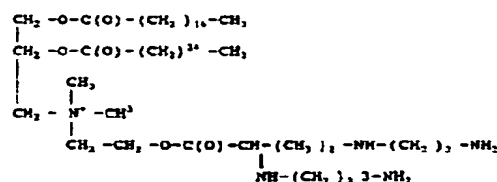
したがって、特に好ましい実施例において、この発明の陽イオン脂質は少なくとも1つのアルキルエーテル基を含む構造を有するR<sup>1</sup>の誘導体である。陽イオン脂質のこのクラスの具体的なメンバーは不飽和の一位点を有する長鎖アルキル基を有し、かつ以下の構造を有するDOR I ジエーテル(DOR I E)である。



代謝可能なより毒性の少ない化合物を要求する応用に対して、アシル結合によって付加された長鎖R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>脂肪族基を有するCLは好ましい。したがって、他の好ましい実施例において、この発明の陽イオン脂質は公式1の構造特性を有するR<sup>1</sup>の誘導体を含むが、以下の構造を有するたとえばDOR I ジエステルのような少なくとも1つのアシル基を含む。

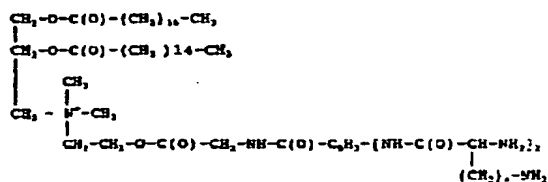


ルアミノプロピル-β-ヒドロキシルアミンによって置換され、SPC-DPR I-ジエステルと示され、以下の構造を有する。

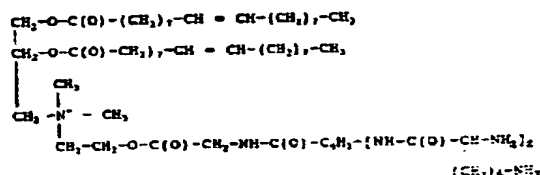


この型の他の脂質の一例において、塩基性アミノ酸リシンはリンカー分子によって脂質の同一のヒドロキシル部に結合される。リンカー分子は任意のジアミノカルボン酸、それによってリシンが同時に多重結合部位に結合可能な分枝分子においてペンダントとして固定される2つのアミノ部位を有するアルキル、アリールまたはアラキルのいずれであってもよい。好ましい実施例において、リンカー分子は任意のアルキルアミノ酸であってもよいスペーサーアームによってヒドロキシ脂質のヒドロキシル基に結合される。グリシンは好ましいスペーサーアームである。この型の代表的な陽イオン脂質は、ジアミノ安息香酸およびグリシンスペーサーによってDPR Iのヒドロキシル部に結合されて、3, 5-(N, N-ジ-リシル)-ジアミノベンゾイル-グリシル-3-(DL-1, 2-ジバロミトイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)を形成

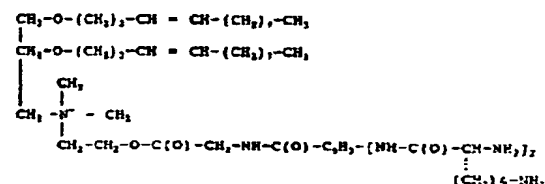
するリシンを含む。この脂質は、D L Y S - D A B A - G L Y - D P R I - ジエステルと示され、以下の構造を有する。



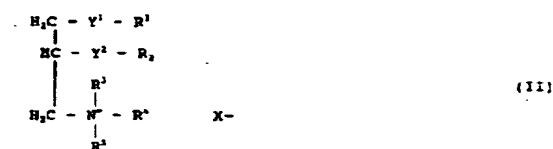
このクラスの特に好ましい化合物は以下の構造



を有するD L Y S - D A B A - G L Y - D O R I - ジエステルであり、さらに以下の構造



したがって、本発明者らは以下の公式を有するこの発明の他の局面に従う陽イオン脂質、



またはその光学な異性体を合成し、この式において

Y<sup>1</sup> および Y<sup>2</sup> は異なり、かつ O-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-、または OH のいずれかであり、

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は個々に欠けているかまたは C<sub>1</sub>、ないし C<sub>20</sub> アルキルもしくはアルケニルであり、

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は同一または異なり、かつ H、C<sub>1</sub>、ないし C<sub>10</sub> アルキル、C<sub>1</sub>、ないし C<sub>10</sub>、アリアルもしくはアラキル、または R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、および R<sup>5</sup> のうちの少なくとも2つは一緒に摂取されてキタクリジノ、ビペリジノ、ピロリジノ、またはモルホリノを形成し、

n は 1 ないし 22 であり、さらに

X は非毒性アニオンである。

この発明の一局面に従って、CL は細胞内配達系で使用するための脂質小嚢またはリポソームの調製のための製剤において他の脂質と組合わされる。この製剤は好ましくは正に荷電された脂質、負に荷電された脂質、中性脂質およ

を有するD L Y S - D A B A - G L Y - D O R I - ジエステルである。

この形の他の分子は、ヒスタジンおよびアルギニンもしくは類似体もしくは誘導体または関連の分子を含むこれらの塩基性アミノ酸のような他の塩基性アミノ酸が結合されるリンカーまたはスパーサームを含むことが可能であり、それらは 1-メチルヒスタジンまたは 3-メチルヒスタジンのようなたとえば置換基を有することによって構造的に修正される。これらのアミノ酸またはその類似体のポリマーは同一の型様でリンカーに付加され得る。

β-ヒドロキシエチルアンモニウム部でスパーサおよびリンカーによってこの発明の陽イオン脂質に付加されるアミン含有基は、アルキル、アルケニル、アリアルならびに R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、および R<sup>5</sup> のアラキル基によるアミンの四級化によって脂質構造にさらに疎水性領域を与え得る。このように、付加的な陽イオン基およびある場合には付加的な疎水性基を同様に含む組立てられた脂質付加物は、細胞膜との相互作用が可能な付加的な部位を組み込み、それによって陽イオン脂質の細胞内配達能力を増大する。

いくつかの応用にとって、生体外応用および特に生体内で使用される場合の双方において使用される陽イオン脂質が代謝可能でありかつゆえに非毒性であり、さらにエーテル結合されたアルキル基を有する脂質種と関連する実質的なトランスフェクション特性を保持することは重要である。

β-コレステロールまたは類似のステロールの混合物から調製される。正に荷電された脂質はこの発明の陽イオン脂質のうちの 1 つだけであってもよいし、これらの混合物、または陽イオン脂質 DOTMA、DOTAP、もしくはその類似体との組合わせるこの発明の陽イオン脂質のうちの 1 つであってもよい。中性および負に荷電された脂質は天然のもしくは合成リン脂質またはモノー、ジ-、もしくはトリアシルグリセロールのいずれかであってもよい。天然のリン脂質は典型的に動物および植物源からのものであり、たとえばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、またはホスファチジルイノシトールなどである。合成リン脂質は典型的に同一の脂肪酸基を有するものであり、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンおよび対応する合成ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルグリセロールを含むが、それらに制限されない。中性脂質はホスファチジルコリン、カルジオリビン、ホスファチジルエタノールアミン、モノー、ジ-、もしくはトリアシルグリセロール、またはその類似体であってもよい。負に荷電された脂質はホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸または類似のリン脂質類似体であってもよい。コレステロール、糖脂質、脂肪酸、スフィンゴ糖脂質、プロスタグラ

ンジン、ガングリオシド、ネオビー (neobee)、ニオソーム (niosome)、または任意の他の天然もしくは合成両親媒性化合物のような他の添加物もまた、リポソームの調製のために従来から既知であるようにリポソーム製剤で使用され得る。

陽イオン脂質小囊を調製するための製剤において、陽イオン脂質は約0.1モル%と100モル%との間の濃度、好ましくは5ないし100モル%、および最も好ましくは20と100モル%との間の濃度で存在可能である。中性脂質は約0と99.9モル%との間、好ましくは0ないし95モル%、および最も好ましくは0ないし80モル%の濃度で存在可能である。正味の正の電荷を有する脂質小囊またはリポソームを生産するために、正に荷電された成分の量は負に荷電された成分の量を超えなければならない。負に荷電された脂質は約0ないし49モル%の間、および好ましくは0ないし40モル%で存在可能である。コレステロールまたは類似のステロールは0ないし80モル%で、好ましくは0ないし50モル%で存在可能である。

少なくとも1つの両親媒性脂質を含む脂質製剤は、自発的に集まって大きさが不均質の一次リポソームを形成可能である。したがって、好ましい方法に従って、少なくとも1つの陽イオン脂質を含むこの発明の脂質試薬は、例12の方法に従ってリポソームとして調製される。成分脂質はクロロホルムのような溶剤に溶解し、その混合物はガラ

ス容器の内部表面上の膜として蒸発乾燥した。水性溶剤中に懸濁すると、両親媒性脂質分子は集まって一次リポソームを形成する。もしたとえば生物活性物質のような他の分子が水性溶剤中に存在すれば、これらはリポソーム内に捕えられるであろう。そうでなければ、空のリポソームが形成されるであろう。その脂質誘導体の形状の生物活性物質は、リポソーム製剤の成分脂質に加えられて水和するとすぐリポソームの壁に組込まれ得る。

これらの一次リポソームは上に参照された凍結融解法によって選択された平均直径まで低減される。この発明のC1はトランスフェクション処置に先立って均一の大きさの小囊に形成され、その方法は文献に発行されかつ当業者に既知の小囊生産のための方法に従い、それはたとえばフェルグナー、ピー・エル (Falgout, P. L.) 他 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 7413-7417 (1987年) によって説明される水性溶液中の脂質からなる自発的に形成されたリポソームの音波処理、またはジェイ・ウィルシャット (J. Wiltschko) 他 Biochemistry 19: 6011-6021 (1980年) の逆相蒸発法、または凍結融解およびエクストルージョン (メイヤー、エル (Mayer, L. ), Biochim. Biophys. Acta 858: 161-168 (1986年) などである。単一ラメラ構造および直径が約50ないし約200  $\mu\text{m}$  の均一の大きさを有する生理学的生体内用途に適したリポソーム

を調製するために、一次リポソームは凍結融解およびエクストルージョンプロセスによって好ましくは処理される。

調製の他の適した従来の方法はバンガム、エイ (Bangham, A. ) 他 J. Mol. Biol. 23: 238-252 (1965年)、オルソン、エフ (Olson, F. ) 他 Biochim. Biophys. Acta 557: 9-23 (1979年)、ソウカ、エフ (Souk, F. ) 他 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75: 4194-4198 (1978年)、メイヒュー、イー (Mayhew, E. ) 他 Biochim. Biophys. Acta 775: 169-175 (1984年)、キム、エス (Kim, S. ) 他 Biochim. Biophys. Acta 728: 339-348、およびフクナガ、エム (Fukunaga, M. ) 他 Endocrinol. 115: 751-761 (1984年) によって開示されるものを含むが、それらに制限されない。

#### トランスフェクションパラメータ

本発明者らは数個の因子が生産される遺伝子生産物のレベルによって決定されるように陽イオン脂質媒介トランスフェクションの効率に影響を及ぼすことを発見した。

#### 1. 陽イオン脂質製剤

##### リゾ脂質化合物

多量の本質ホスファチドをトランスフェクションのための脂質製剤に組込むことは、トランスフェクションの効率を増す効果をも有する。

例20に示されるように、DOTMAおよびDOPEを

含むトランスフェクション製剤 (登録商標リポフェクテン) にモノオレオイルリゾホスファチジルコリンを、0.5のリゾホスファチド対DOTMAのモル比までの量で添加することは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードするDNAを細胞へトランスフェクトする効率を100%より多い量増大可能である。

自己集合脂質構造の現行の理論に従って、充填圧迫の熱力学的な復合力、および水性媒質を有する脂質極性頭基の相互作用的な自由エネルギーは、脂質小囊のジオメトリおよび構造を決定する。エントロピーは小さな構造に味方し、かつ充填圧迫は密な充填に対抗する。したがって、水性媒体において、一本鎖脂質の均一系のためのエントロピー的に好ましい構造は、約15ないし20オングストローム単位の相対的に小さな半径を有する単一層ミセル構造であり、一方その脂質鎖はそれほど密に充填できない二本鎖脂質の対応する系のためのものは、約50オングストロームの肉厚を有する水性内部を有する二重層構造である (イスラエラキビリ、ジェイ・エヌ (Israelachvili, J. N. ) 他 Biochim. Biophys. Acta 470: 185-201 (1977年) ) 。

脂質の高い濃度で、小囊はお互いに作用して凝集し、各々の外部脂質膜を一体に融合させる。膜融合は生物学的プロセスで広く発生する現象である。脂質小囊が細胞膜の脂質二重層と融合することを起こすのはこの現象であり、

それによって脂質小囊の内容物は細胞質に配達される。しかしながら、脂質小囊の融合的特性がお互いにその凝集を引起す場合、その直径はトランスフェクションに効果的な範囲の直径を超えて増大することが可能である。小囊の凝集を結果としてもたらす陽イオン脂質小囊の融合的挙動は、脂質製剤の陽イオン極性頭基と相互作用する水性媒質中のアニオンの存在によって誘発される（ダズグーンズ、エヌ（Duzgunes, N.）他の「バイオケミストリ」(Biochemistry) 29:9179-9184 (1989年)）。

脂質製剤における効果的な濃度の一本鎖脂質の存在は凝集につながる融合的挙動に対抗する一方で、小囊内容物が細胞に配達されることを許容する融合的挙動を維持すると考えられる。一本鎖脂質は脂質系の熱力学的な平衡をシフトしてより密な充填を許容し、かつ凝集に抵抗するように形成された脂質小囊の安定性に味方する。しかしながら、一本鎖脂質のレベルが増大するにつれて、トランスフェクションの効率はもはや改良されず、それどころか減少する。この効果は細胞膜との融合を抑制する脂質小囊の融合に対する抵抗性の増大、または一本鎖（リゾ）脂質の有毒特性、または両方の効果のためであるかもしれない。

したがって、改良されたトランスフェクション製剤は極性頭基を含み、かつトランスフェクションを促進することが可能な量の本鎖脂質を有する両親媒性脂質を含む一方で、製剤から集まった脂質小囊の細胞膜との融合を達成す

る能力を保存したままである。

適切なリゾ脂質は中性の、正に荷電された、または負に荷電された頭基を有するリン脂質のリゾホスファチドを含む。中性の頭基を有するリン脂質が好ましい。特に好ましいリゾホスファチド種はリゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンである。他の適した一本鎖リゾ脂質は公式Iまたは公式IIの陽イオン脂質化合物のいずれかを含み、Y<sup>1</sup> および R<sup>1</sup> 全体または Y<sup>2</sup> および R<sup>2</sup> 全体のいずれかは-OHである。この目的のために好ましい陽イオン脂質は、ここに開示されたローゼンタール抑制因子エステルおよびエーテル誘導体、およびDOTMA、DOTAPおよび類似の飽和類似体のリゾ形を含み、典型的にC<sub>14</sub>、C<sub>16</sub> および C<sub>18</sub> アルキル鎖を含む。

一本鎖リゾ脂質化合物はトランスフェクション製剤の二重脂質類陽イオン脂質の濃度に対して0.5までのモル比濃度において効果的であることが発見された。

#### 中性脂質の存在

いくつかの条件下で、トランスフェクション脂質製剤における中性脂質の存在はトランスフェクションの効率を低減するように思われる。DOPEまたはDOPCの存在はRNAトランスフェクションにおけるDOTMAの有効性を低減したが、一方でコレステロールは抑制的でなくなった（例17および18、図3-4）。しかしながら、DO

RIは5/5のモル比のDOPEと結合されたときにDNAトランスフェクションにおいて最も効果的であった（例22、図8）。この効果はトランスフェクトされたポリヌクレオチドの物理的構造に関連するかもしれない。

#### 2. トランスフェクション条件

##### 血清の存在

血清の存在は陽イオン脂質/RNA複合体の形成を抑制するよう思われるが、トランスフェクション法それ自体における、つまり血清のない場合に形成された陽イオン脂質/ポリヌクレオチド複合体を添加した後の血清の存在はわずかに抑制的であるにすぎない（例15および22）。前の結果は血清がトランスフェクションを抑制することを示しているように思われるが、しかしながらこれらの実験（図1-5）は血清があるときでさえ比較的よい活性を示す。

##### 細胞密度

陽イオン脂質媒介トランスフェクションは細胞密度の範囲にわたって効果的に実行され得る。pSV2-lacZのCOS.7細胞へのトランスフェクションは、5000細胞/ウェルから40000細胞/ウェルでの融合性の高い細胞までの細胞密度で例14Bの方法に従って実行された。融合性の高い細胞の成功したトランスフェクションは、細胞分割がDNAの発現または機能的配達にいずれにとっても必要とされないことを示すが、しかしながら最適な発

現は20000細胞/ウェル（90%融合性）で観察された。細胞密度を5000ないし10000細胞/ウェルにさらに減少すると、最適発現のより低い脂質濃度へのシフトにつながった。この結果はより高い毒性（細胞当りのより多い量の陽イオン脂質）のためであり、かつ一般にはより少ない数の細胞に対応するより低い発現のためであるかもしれない。

##### トランスフェクションのための細胞株の選択

例14Bのプロトコル下でのDOR1/DOPE 5/5脂質製剤を使用するpSV2-lacZのトランスフェクションが、多数の異なる細胞株に対して行われた。50pg/ウェルから20000pg/ウェルの広い範囲のβ-ガラクトシダーゼ活性は、これらの細胞間で以下のよう

LM	50 pg
LM-929	80 pg
CV-1 (ATCC CCL70)	900 pg
COS.7 (ATCC CRL 1651)	1000-2000 pg
BHK (ATCC)	20,000 pg

発現のレベルの莫大な変化はDNA採取および細胞内代謝因子の双方の差によっておそらくは引起こされる。それは遺伝子産物の収率が優先される場合は考慮すべき因子である。

##### 応用

この発明の陽イオン脂質は単独またはたとえばDOTMAまたはDOTAPなどの他の既知の陽イオン脂質との

組合わせのいずれかで、リボソームまたは他の脂質小囊の使用を含む任意の方法で有利に使用されて、生体外または生体内のいずれかで細胞内で物質を配達することが可能である。代謝可能なエステル結合を有するこれらの脂質は生体内使用に好ましい。

#### 1. 遺伝子生産物の生産

考えられる使用は現在既知でありかつ両親媒性脂質を使用する方法に対応するトランスフェクション方法を含み、それは登録商標リポフェクションのような市販の陽イオン脂質調製物を含み、かつ従来の陽イオン脂質技術および方法を使用する。したがって、ここに開示される脂質組成物は、治療的に活性なポリペプチドをコードするDNAまたはmRNA配列の細胞内配達を容易にするために使用可能であり、それは米国特許出願連続番号第326, 305号および第467, 881号において説明され、これらの出願は引用によりここに譲渡される。それらは発現された遺伝子生産物、ポリペプチドまたは蛋白質それ自体のリボソーム配達のために同様に使用され得る。このようにDNAおよびmRNAポリヌクレオチドまたは蛋白質の陽イオン脂質媒介配達は、デューシェヌ (Duchenne) ジストロフィー (クンケル, エル (Kunkel, L.) およびホフマン, イー (Hoffman, E.) *Brit. Med. Bull.* 45 (3) : 630-643 (1989年) ) または囊胞性繊維症 (グッドフェロー, ビー (Goodfellow, P.) 「ネイチャ」 (Nature),

インをコードする遺伝子を一緒に注射することによって高められ、さらにリンパ系細胞を刺激することが可能である。

陽イオン脂質方法は他の方法に比べて好まれ、それはリン酸カルシウム、DEAEデキストランまたは電気穿孔法より便利でかつ効率的である。

陽イオン脂質媒介配達に相当な他の治療的に重要なポリヌクレオチドは、T' o, P. 他 *Annals New York Acad. Sci.* 570 : 220-241 (1987年) によって説明されるように、遺伝子生産物の生産を排除または低減するのに有用なアンチセンスポリヌクレオチド配列を含む、様々な技術の負に荷電された新規のオリゴヌクレオチドである。不足しかつ合成するのに費用がかかるこれらのオリゴヌクレオチドの多くは、通常の現行法に従って、負に荷電された脂質のリボソームに被包によって非効率的にとらえられる。本発明者らはこれらのオリゴヌクレオチドが100%に近い効率で陽イオンリボソーム内にとらえられることを示す実験研究をしている。ハンベル (Hampel) 他 *「核酸研究」 (Nucleic Acids Research)* 18 (2) : 299-304 (1990年) によって説明されるような「ヘアピン」型、またはチェック、ティー (Cech, T.) およびバース、ビー (Bass, B.) の *Annual Rev. Biochem.* 55 : 599-629 (1986年) によって説明される「ハンマーヘッド」型のいずれかのリボザイムまたは触媒性RNA種の、開示された陽イオン脂質による、配達もま

341 (6238) : 102-3 (1989年9月14日) ) などの欠陥遺伝子またはその生産物が、識別された任意の遺伝子病を治療するための欠乏したまたはない遺伝子生産物を供給することによって、遺伝子病のための治療法を提供することが可能である。

上述された陽イオン脂質媒介細胞内配達または、免疫原をコードするポリヌクレオチドまたは免疫原それ自体のいずれかを配達することによって免疫ポリペプチドを細胞に与えることも可能である。

上述のトランスフェクション法は陽イオン脂質をDNA、RNAまたは蛋白質とともに生体内で動物の細胞に直接注射することによって適用され得る。しかしながら、陽イオン脂質は細胞の生体外トランスフェクションを容易にするのに特に効果的であることが最近示された。したがって、上述の治療法は陽イオン脂質配達法を使用する動物の細胞のいくつかの生体外トランスフェクション、および細胞の動物への再導入によって代替的に行なわれ得る。陽イオン脂質を使用して高い効率で細胞をトランスフェクトする能力は免疫化のための代替の方法を提供する。抗原のための遺伝子が陽イオン脂質媒介配達によって動物から除去された細胞に導入される。トランスフェクトされた細胞はここで抗原を発現し、免疫系が(今の)内因性抗原に今応答することが可能である動物に再注射される。このプロセスはアジェパントまたはリンフォカインまたはかかるリンフォカ

たこの発明の範囲内である。

この発明の特に好ましいと考えられる用途は、上に説明され、かつその標的としてHIVゲノムの~~rev~~部位を有するもののようなアンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムのいずれかの配達である(「サイエンティフィック・アメリカン」(*Scientific American*)、1988年10月、頁56-57)。マツクラ、エム (Matsukura, M.) 他 *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 86 : 4244-4248 (1989年) は、その部位に特異的な28-merホスホロチオエート化合物抗HIV (抗-~~rev~~ トランスアクチベータ) を説明する。

ここに開示された陽イオン脂質の他の治療的用途は、抗ウィルス性の効果を有する、ジデオキシヌクレオチド、ジデオキシデオキシヌクレオチドなどのヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体、5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジンまたは5-フルオロウラシルなどのハロー置換されたプリンまたはピリミジン環を有するヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体、3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)などのハローおよびアジド置換されたリボース部を有するヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体、リボース部(炭素環式ヌクレオシド)で糖基の代わりに置換された炭素を有するヌクレオシド類似体、またはアシクロビルまたはガンシクロビル(DHPG)などの非糖式ベントースを有するヌクレオチド類似体のリボソーム配達を

含む。かかる類似体のリボソーム配達、ホステトラ (Hostetter) およびリッチマン (Richman) によって 1987 年 9 月に出願された米国特許出願第 009,755 号に開示される。これらの類似体の抗ウィルス性能力はそれらがリン脂質誘導体として細胞に与えられた場合増大することが発見されている。これらの誘導体は細胞への投与のためにリボソーム構造に超込まれることが可能であり、それによって標的細胞に非常に多くの量の薬剤を配達することが可能な、より毒性の少ないより安定したリボソーム複合体を形成する。ヌクレオシド類似体の効果的な抗ウィルス性脂質誘導体は、ホスファチジル 2', 3'-ジデオキシヌクレオシド、2', 3'-ジデヒドロヌクレオシド、3'-アジド-2'-デオキシヌクレオシド、3'-フルオロデオキシヌクレオシドおよび 3'-フルオロジデオキシヌクレオシド、9-β-D-アラビノフラノシルアデニン (araA)、1-β-D-アラビノフラノシルシチジン (araC)、非置換リボース基を有するアシクロビルおよびガンシクロビルなどのヌクレオシド、またはジホスフェートジグリセリド誘導体と同一のヌクレオシド類似体を含む。陽イオン脂質媒介リボソーム配達を使用する HIV 感染の治療のための抗ウィルス性または抗レトロウィルス性ヌクレオシド類似体の脂質誘導体の好ましい層は、3'-アジド-2', 3'-ジデオキシピリミジン、3'-ハロピリミジンジデオキシヌクレオシド、または 2', 3'-ジデヒドロ

-2', 3'-ジデオキシヌクレオシドのリン脂質誘導体、たとえばホスファチジル 3'-アジド-3'-デオキシチミジン (3-AT) またはホスファチジル 2'-クロロデオキシアデノシンである。ヘルペス、サイトメガロウィルスおよび B 型肝炎感染を含むあるウィルス感染症は、アシクロビル、ガンシクロビル、1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードシトシン (FIA C) または 1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル (FI A U) を含むヌクレオシド類似体で効果的に治療される。これらの薬剤のリン脂質誘導体、好ましくはホスファチジルおよびジホスフェートジグリセリド誘導体は、この発明に従う陽イオン脂質リボソーム配達系を使用してこれらの病気に投与され得る。抗ウィルス性ヌクレオシドの脂質誘導体の構造、合成およびリボソーム配達の詳細は、米国特許出願連続番号第 216,412 号、第 219,485 号および第 221,888 号において示され、引用によりここに援用する。

このように配達され得る他の治療的に重要な薬剤の中には、インターロイキン-2、腫瘍壊死因子、組織プラズミノゲンアクチベータ、因子 V IIII、エリトロポイエチン、表皮成長因子、成長ホルモン放出因子、神経成長因子などの成長因子ならびに組織インスリン、カルシトニンおよびヒト成長ホルモンなどのホルモンと同様にリシン、ジフテリア毒素またはコブラ毒因子のような病気または悪性の細

胞を排除することが可能である癌性ペプチドなどの生化学種を含むペプチドである。

開示された脂質の用途はまた、当業者に既知であり、かつダズグーンズ、エヌ (Dazgounz, E.)、「サブセルラー・バイオケミストリー」(Subcellular Biochemistry) 11:195-286 (1985 年)に説明されたような方法に従って、細胞内で配達されるべき様々な他の薬剤の被包に対しても考えられる。配達されるべき材料は、蛋白質またはポリペプチド、特に負に電荷された分子、モノクローナル抗体、RNA 安定化因子および他の転写および翻訳調節因子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムおよび細胞内活性を進行させる任意の分子であり得る。かかる被包はさらに述べられた薬剤を細胞外環境の物質による非生産的腐敗形成からさらに保護する。

#### 製薬的製剤

この発明の陽イオン脂質は治療薬剤を動物の体の様々な道筋によって、かつ様々な部位に配達するための製薬製剤において使用され、所望の治療効果を達成することが可能である。治療薬剤の局所または全身系の配達は、体腔への製剤の適用または挿入、エーロゾルの吸入またはガス注入を含む投与によって、または筋肉、静脈、皮内、腫膜、皮下および局所的投与を含む腸管外導入によって達成され得る。これらの製剤における陽イオン脂質の効果は、その細胞内配達を容易にすることによってそこに含まれる治療薬

剤の能力および効率を高めることである。

局所的製剤は皮膚または粘膜に有利に適用されるものである。標的粘膜は口、鼻咽頭および胃、または胆もしくは肛門直腸粘膜を含む胃腸管の粘膜であり得る。他の標的組織は耳および目の組織の接近可能な表面および管であり得る。局所的製剤に存在する陽イオン脂質は、保護膜のバリヤ特性をかき乱すことによって、または登録商標アゾン (Azon) のような分散促進剤または浸透促進剤を導入することによって、またはこれらの浸透促進剤の活性を促進することによって、皮膚の角質層のような標的組織への生物活性分子の導入を容易にするように作用し得る。

小さな有機分子からなる薬剤のいくつかのクラスは上述のような製剤中で配達され得る。1つのかかるクラスは局所的適用のためのリボソーム製剤で調製され得るステロイド系抗炎症剤を含む。このクラスの薬剤は登録商標シナラー (Synalar) として利用可能なヒドロコルチゾン、フルオシノロンアセニド (シンテックス (Synex)、パロ・アルト (Palo Alto)、カリフォルニア (California) 94303)、登録商標リデックス (Lidex) として利用可能なフルオシノニド (flucisnide) (シンテックス、パロ・アルト、カリフォルニア 94303)、および登録商標デカデルム (Decaderm) (メルク、シャープ・アンド・ドーム (Merck, Sharp and Dohme)、ウェストポイント (West Point)、ペンシルバニア (Pennsylvania) 19

486)として利用可能なデキサメタゾンを含む。

陽イオン脂質を含む他の局所的製剤は、クリンダマイシン、トブラマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシンなどの局所的抗生物質、過酸化ベンゾイルなどの酸化剤、クロトリマゾール、ミコナゾール、ニスタチン (nystatin)、ラクトコナゾール (lactocanazole)、エコナゾール (econazole) およびトルナフテートなどの抗真菌剤、さそうの治療のためのレチン酸、ならびに単純ヘルペスの治療のための薬剤を含み、かつアシクロビルおよびガンシクロビルなどの抗ウィルス性ヌクレオシド類似体を含む調製物である。これらのヌクレオシド類似体製剤は好ましくは抗ウィルス剤の脂質誘導体、特に米国出願連続番号第373,081号に開示されたようなホスファチジルグリセロール誘導体を含み、かつそれ自体がこの発明の1つ以上の陽イオン脂質を含むリポソームに組込まれ得る。

この発明の陽イオン脂質を含む他の製剤製剤は、麻酔または細胞増殖抑制剤、免疫調節剤、生物活性ペプチドまたはオリゴヌクレオチド、日焼け止め剤または化粧品を含む局所的調製物である。局所的用途のための調製物は、クリーム、ローション、軟膏またはゲルの形状の親水性および疎水性塩基を使って便利に調製され、代替的に、この調製物は皮膚にスプレーされる液体の形状であってもよい。陽イオン脂質の効果は真皮の薄層コルニウムを介して活性抗ウ

ル剤の調製を容易にすることである。

1-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3-ビフェニルカルボン酸 (ジフルニサル (diflunisal))、登録商標インドシン (Indacin) (メルク・シャープ・アンド・ドーム) として利用可能な 1-(4-クロロベンゾイル)-5-メトキシ-2-メチル-1H-インドール-3-酢酸 (インドメタシン)、登録商標アドビル (Advil) (メルク・シャープ・アンド・ドーム) として利用可能な 1-(4-クロロベンゾイル)-5-メトキシ-2-メチル-1H-インドール-3-酢酸 (インドメタシン)、登録商標アドビル (Advil) (ホワイトホール・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド (Whitehall Laboratories, Inc.))、ニューヨーク、NY 10017) として利用可能な (±)-2-(p-イソブチルフェニル) プロピオン酸 (イブプロフェン (ibuprofen))、登録商標メクロメン (Meclomen) (パーカー・デイビス (Parker-Davis))、モリス・ブレーンズ (Morris Plains)、ニュージャージー 07950) として利用可能な、N-(2,6-ジクロロ-m-トリル) アントラニル酸 (メクロフェノメート (meclophenamate))、登録商標ナルホン (Nalfon) (ディスタ・プロダクツ・カンパニー (Dista Products Co.))、インディアナポリス (Indianapolis)、インディアナ (Indiana) 46285) として利用可能な、フェノプロフェン (fenopropfen)、アシル酢酸誘導体、登録商標ナプロシン (Naprosyn) (シンテックス、パロ・アルト、カリフォルニア 94303) と

イルス剤の調製を容易にすることである。

目の用途のための類似の調製物は薬理的に効果的な薬剤がチモロール、ベータキソロール (betaxolol)、レボブナロール (levobunolol)、ピロカルピン (pilocarpine)、ならびに局所的適用のために開示された抗生物質およびコルチコステロイドであるものである。

この発明の調剤に従って陽イオン脂質材料とともに経口で、局所的にまたは全身に配達され得る他の薬剤のグループは、たとえば1-アセチルサリチル酸 (アスピリン、バリエル (Bayer))、登録商標フェルデン (Feldene) (ファイザー (Pfizer))、ニューヨーク (New York)、ニューヨーク 10017) として利用可能なピロキカム (pirexican)、登録商標クリノリル (Clinoril) (メルク・シャープ・アンド・ドーム、ウェスト・ポイント、ペンシルバニア 19486) として利用可能な (Z)-5-フルオロ-2-メチル-1-[[p-アルコール (メチルスルフィニル)-フェニル]メチレン]1-H-インデン-3-酢酸 (サリダック (salidac))、登録商標ボルタレン (Voltaren) (チバ・ガイギー (Ciba-Geigy))、サミット (Summit)、ニュージャージー (New Jersey)) として利用可能な 2-[(2,6-ジクロロフェニル)アミノ]-ベンゼン酢酸、一ナトリウム塩 (ジクロフェナック (diclofenac))、登録商標ドロビド (Dolobid)、(メルク・シャープ・アンド・ドーム) として利用可能な 2',4-

して利用可能な 2-ナフトレン酢酸、6-メトキシアールファ-メチル、(+)(ナプロキシン (naproxen))、登録商標トレクテン (Tolactin) (マクニール・ファーマシューテカル (McNeil Pharmaceutical))、スプリング・ハウス (Spring House)、ペンシルバニア 19477) として利用可能な、1-メチル-5-(4-メチルベンゾイル)-1H-ピロール-2-酢酸エステル二水和物 (トルメチン (tolmetin))、およびその誘導体および同族体などのような非ステロイド系抗炎症剤である。

開示された陽イオン脂質を含む製剤調製物の組成物および形状は、薬剤または他の治療剤と組合わせて、投与の意図される経路に従って変化する。

経口投与される調製物は固体、液体、エマルション、懸濁液、またはゲルの形状、または好ましくはたとえば錠剤またはカプセルのような投薬単位形態であってもよい。錠剤は滑石、植物油、ポリオール、ゴム、ゼラチン、澱粉および他の担体のような習慣的に使用される他の成分と組合わせて調合され得る。脂質小嚢は溶液、懸濁液、またはエマルションにおいて適当な液体担体に分散されるか、またはそれと組合わされ得る。

皮下、筋肉または静脈のいずれかの注射を意図した腸管外組成物は、注射の前に液体に溶かすための液体または固体形状またはエマルションのいずれかとして調製され得る。かかる調製物は滅菌されており、静脈に注射されるべき液

体は等張でなければならない。適当な賦形剤はたとえば水、デキストロース、食塩水およびグリセロールである。

この発明の陽イオン脂質は、活性治療剤をエーロゾルの形状で鼻、喉または気管支通路などの体腔に配達するための液体、エマルションまたは懸濁液中に存在してもよい。これらの製剤物における陽イオン脂質および他の混合剤に対する活性成分の割合は投与形態が必要とするように変化する。

#### 陽イオン脂質化合物の調製

##### A. ローゼンタール抑制因子の誘導体

ローゼンタール抑制因子の類似体であるこの発明の陽イオン脂質は、例1ないし5に説明されるようなアミノ基の四級化が後に続く、3-ジメチルアミノプロパンジオールのアシルおよびアルキル置換によって合成され得る。ジエチル誘導体を形成するためのジオールの第一級および第二級アルコール基のアルキル置換は、1, 2-O-ジオレオイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-酢酸ヒドロキシエチルアンモニウムの合成について例1で説明されるように、3-ジメチルアミノ-1, 2-プロパンジオールをベンゼンのような中性溶剤の中でアルキルまたはアルケニルメタンスルホネートで処理することによって達成される。ジエステル誘導体を形成するための第一級および第二級アルコール基のアシル置換は、DL-1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-酢酸ヒドロキシエチル

アンモニウムの合成について例3で述べられるように、延長された時間の間高められた温度で適当な溶剤の中で、ハロゲン化アシルで3-ジメチルアミノプロパンジオールを処理することによって達成される。混合されたアシル/アルキル誘導体の合成は、たとえばベンジル化によって出発ジオールの第一級または第二級アルコール基をブロックして、アルキルまたはアルケニルメタンスルホネートと縮合すると、1-O-ベンジル-2-O-アルキルグリセロール誘導体を生成するリゾ化合物を形成することによって達成される。ハロゲン化アシルでのアシル化が後に続く脱ベンジル化は、1-アシル、2-O-アルキル誘導体を生成する。代替的に、ジオールはアルキルメタンスルホネートでアルキル化され、1-アルキル、2-リゾ誘導体は例6、パートAで説明されるように、アシル無水物で分離されかつアシル化され得る。

このように置換されたジオールの四級化はハロ誘導体の形状で四級化基での処理によって、4-ジメチルアミノピリジンのような塩基性触媒の存在するところで実行される。

##### B. 付加的な陽イオンおよび疎水性部を含むローゼンタール抑制因子付加物の合成

多重アミノ基が存在する陽イオン脂質組成物の1つの型は、本来塩基性であり、かつ塩基性分子に付加されたカルボキシル基を介してたとえばヒストン、スベルミンまたはスベルミジンのようなDNAに結合することが知られてい

る型の分子(ジェービー・ペイア他のProc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986 (1989年))を、たとえばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のような縮合剤を使用して、DORIまたはDPR1ジエステル、ジェーテルまたはエステル/エーテルの利用可能なヒドロキシル基に付加することによって調製される。

垂れ下がるリシン基の付加を含む他のアプローチは、ヒドロキシ脂質の利用可能なヒドロキシル基に結合することが可能であり、かつリシンに結合することが可能な少なくとも2つの部位を有するリンカー分子を使用する。このアプローチはジアミノ安息香酸を介して2つのリシン基をDPR1-ジエステルに付加することによって例証される。

##### C. DOTMA, DOTAPおよびその類似体のエステル/エーテル誘導体の合成

公式11に対応し、かつそれらに付加されるアシルおよびアルキル基の双方を有する陽イオン脂質は、3-(ジアルキルアミノ)-1, 2-プロパンジオール(その公式3に示される)が例6の方法に従って混合されたアシル/エーテル誘導体に変換されることを除いて、米国特許第4, 891, 335号に説明されるように本質的に合成され、それは引用によりここに援用される。

この発明の陽イオン脂質分子の任意のものは、エステル結合またはエーテル結合のいずれかによってグリセロール部に結合されるアルキル鎖を含むように合成され得る。し

たがって、この分子はジエステル、ジェーテル、1-エーテル-2-エステルまたは1-エステル-2-エーテルのいずれであってもよい。構造トランスフェクション活性関係は、最適のポリヌクレオチド配達のために、分子はジェーテル型であるはずであることを示すが、これらの分子は生体内で代謝することが困難であり、かつ体内での脂質の蓄積による毒性効果を結果としてもたらすことが予期される。ジエステル化合物は容易に代謝されるはずであるが、しかしながら、これらの化合物は対応するジェーテル陽イオン脂質ほどポリヌクレオチドを配達する際に活性的ではない。エーテル-エステル分子はジェーテル分子とジエステル分子との間の中間のトランスフェクション活性を有するが、ジェーテル分子と違って、エーテル-エステル分子は体によって代謝されかつ排せつされ得る。たとえば血小板凝集因子、1-O-アルキル-2-アセチル-sn-グリセロール-3-ホスホコリンのような類似のリン脂質は、肺および皮膚の繊維芽細胞の上皮性細胞を含む数種の細胞型によって代謝される(クマー、アール(Kumar, R.)他、*Biochim. Biophys. Acta* 917: 33-41 (1987年))。陽イオン脂質のエステル/エーテル種のこの特徴は、リポソーム媒介トランスフェクションが生体内、たとえば気管への注入で非常に効率的に発生し得ることを示す研究の点からみて重要である(ブリグハム、ケイ・エル(Briggman, R. L.)他、*Amer. J. of the Medical Sciences*) 2

98(4):278-281(1989年))。エーテル／エステル分子の改良されたトランスフェクション活性および代謝性のために、これらの薬剤は生体外および生体内の双方で特定の利点を有するであろう。

ここに説明される化合物の非毒性塩類はこの発明の範囲内に含まれる。かかる塩類は無機酸および有機酸を含む製造的に非毒性の酸から調製され得る。かかる酸は塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、酢酸、安息香酸、クエン酸、グルタミン酸、乳酸などを含む。製造的に受入れ可能な塩類の調製については、エス・エム・バージ(S. M. Berge)他の「ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス」(Journal of Pharmaceutical Sciences)、66:1-19(1977年)を見られたい。引用によりここに援用する。この発明の陽イオン脂質試薬は、空のリボソームのような水性溶液で調製されかつ貯蔵されてもよいし、または選択された生物活性物質のためのカプセル化剤として後に使用されるように製剤後に乾燥して貯蔵されてもよい。

#### 最適なトランスフェクションおよび細胞内配達パラメータ

細胞内配達を達成する際に陽イオン脂質種の有効性を正確に評価することは、製造活性関係が最適化されたスタンダード製剤および方法を使用して決定されることを必要とする。

エラーゼメッセージを含むメッセンジャーRNAと比較することによって示された。図3は陽イオン脂質投与反応および血清効果を示す登録商標リポフェクチン(DOTMA/DOPE 50:50)を使用するトランスフェクションから得られた結果を示す。より高い脂質濃度が血清のある場合に最大反応を得るために必要とされる。

大量の中性脂質を含む製剤はますます活性でなくなるように見えるので、中性リン脂質成分を欠く代替の製剤がテストされた。トランスフェクション製剤は例7、8および9の方法に従って、中性リン脂質成分がある場合とない場合の双方で調製された。陽イオン脂質DOTMAは単独またはコレステロールと組合わされてのいずれかで製剤に組合わされ、かつ以下の例18の表で示されるように中性脂質DOPEを含む類似の製剤と比較された。最も高い活性は特にコレステロールが存在する場合にリン脂質成分を欠く製剤で発生する。トランスフェクションの同一の組から取られた図4は、リン脂質を含まない新しく規定された陽イオン脂質組成物(DOTMA/DOPE/コレステロール 70/0/30)がずっと高いレベルのmRNA発現を生じ(2つの図3および図4のY軸上の目盛を比較されたい)、かつこの試薬は血清の存在する場合および存在しない場合において類似の活性を有することを示す。

#### 対応する陽イオン脂質のより多くの塩性種の比較

陽イオン脂質の基のトランスフェクション有効性は、説

本発明者らは以下のような実験に従って、DOTMA、効果的なトランスフェクション剤であると知られている陽イオン脂質を使用し最適な条件を調べた。

#### A. 脂地の特性

陽イオン脂質媒介トランスフェクションにおける重要な方法上の問題は、いかにして血清がトランスフェクション方法に導入されるかに関する。例15および16の研究は、脂質小囊がポリヌクレオチド分子とともに複合体を形成する第1のステップにおける血清の存在はトランスフェクションに抑制的であることを示す。しかしながら、複合体が血清のないところで生じることをまず可能にする場合は、これらの複合体はかかる抑制なしに低い濃度(5ないし15%)の血清を含む組織培養媒体に添加され得る。図1と比較して、図2においてmRNAの機能し得る配達および発現の大幅な増加が発生することに注意されたい。

さらに、図2に示された方法論によってトランスフェクトされた細胞はより効率的に遺伝子産物を発現するだけではなく、組織培養下においても目に見えて健康である。トリパンブルー排除試験を使用する毒性研究は、細胞が血清のあるところではより高い陽イオン脂質濃度に抵抗することが可能であることを示す。

#### B. 脂質製剤の特性

最適活性のための重要な製剤特徴は、細胞をトランスフェクトする際に24の陽イオン脂質製剤の有効性をルシフ

明されるように決定された最適なトランスフェクション条件下、つまりリン脂質成分を含まない70/30のCL/コレステロール比での脂質製剤を使用し、かつ脂質小囊およびmRNAの第1段階の結合が血清のない場合に発生することを許容するような条件下で評価された。前の例と同様に、組織培養3T3マウス細胞はルシフェラーゼ酵素をコードするRNAでトランスフェクトされた。市販で入手されるローゼンタール抑制因子(RI)、DL-2、3-ジステアロイルオキシプロピル(ジメチル)-β-ヒドロキシエチル臭化アンモニウム(シグマ(Sigma))、セント・ルイス(St. Louis)、MO.)は、例11に従って脂質小囊として調製され、かつトランスフェクションで使用するための陽イオン脂質として非常に弱い活性を有することが発見された。RIのDPR1ジエステル(ジバルミトイル)およびDOR1ジエステル(ジオレオイル)誘導体が合成された。本発明者らはまた、(2, 3-ジバルミトイル)-prop-1-イル-N, N, N-トリメチルアンモニウム(DPTMA)、DOTMAの類似体、効果的な薬剤であると知られる陽イオン脂質を合成した。DOTMA自体と同様に合成された脂質、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムが、ルシフェラーゼRNAで組織培養細胞をトランスフェクトする能力について評価された。データは図5に示される。最初の発見はローゼンタール抑制因子

の親水性部位に存在するヒドロキシエチル部は、この基を欠く対応する陽イオン脂質に比べて陽イオン脂質のトランスフェクト有効性を増大するということである。さらに、この発明の代表的な陽イオン脂質、DORI、はたとえそれが前例で示されるエーテル基を欠いているとしても、DOTMAより効果的なトランスフェクト剤であり、優れたトランスフェクト活性を与える。これらの実験の最適化されたトランスフェクト条件下において、DOTMAは市販のリポフェクテンと比べて大きく高められたトランスフェクト特性を有することに注目されたい。さらに、より優れたトランスフェクト剤DORIは代謝可能な非毒性トランスフェクト剤として優れている。

要するに、これらの研究は、CLを使用する細胞の効果的なトランスフェクションは適用に最も効果的な陽イオン脂質、最適なトランスフェクション製剤および最適のトランスフェクション方法の使用を選択することを必要とすることを示す。

この発明はその好ましい実施例の代表であり、かつこの発明の範囲を制限するものとは解釈されるべきではない以下の例によってよりよく理解され得る。

例1：1, 2-O-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピル-β-酢酸ヒドロキシエチルアンモニウム (DORI ジエーテル) の合成

ステップ(a)：オレイルメタンスルホネート

の蒸留されたばかりの乾燥ベンゼン中の水酸化カリウム3.7gが、分子ふるいを含むソックスレー (Soxhlet) 器具を備えた300mlの三口丸底フラスコで2時間通流された。100mlの乾燥ベンゼンに溶解されたオレイルメタンスルホネート5.78gはこの反応混合物にゆっくり滴下され、通流はさらに4時間続けられた。反応期間の終わりに、冷たい水およびジエチルエーテルが添加された。有機相は酸および重炭酸で上記のように連続的に洗浄された。黄色の粗生成物はシリカゲルGプレート上の薄層クロマトグラフィー上に3つのスポットを与え、容積で(50/15/5/5/2)のクロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水で展開された。必要とされる化合物は以下のようにケイ酸カラムクロマトグラフィーによって精製された。約3.0gの上記材料がシリカCC7、バイオラッド (BioRad) (40.0g) カラム上で充填され、クロロホルム(200ml)、クロロホルム/メタノール5% (200ml)、10% (250ml)で、および最後にメタノール(500ml)で連続的に溶出された。純粋な化合物は10%メタノールフラクションで溶出され、上記系において展開されるシリカゲルGプレート上でクロマトグラフィーにかけたとき、0.45のRf値を与えた。

ステップ(c)：1, 2-O-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピルグリセロール-β-酢酸ヒドロキシエチルアンモニウム

滴下漏斗を備えた500mlの三口フラスコにおいて、5.0g (18.7mmole) のオレイルアルコール (Nuチェック (Check) Prep. イリージアン (Elysian)、MN56028) が6.67mlの乾燥ピリジンおよび100mlの蒸留されたばかりのクロロホルムに溶解された。この溶液は水浴で冷やされ、50mlの乾燥クロロホルムに溶解された3.22g (28.14mmole) のメタンスルホニルグリッド (Nuチェック (Check) Prep) が1時間の間1滴ずつ添加された。反応混合物は室温でさらに4時間攪拌することが許容された。反応時間の終わりに、30mlの冷たい氷水および50mlのジエチルエーテルが添加された。有機層が50mlの0.5N冷HCLで二度洗浄され、その後50mlの冷たい0.5N重炭酸ナトリウムで洗浄された。最後に、有機相は無水硫酸ナトリウムによって乾燥され、ロータリーエバポレータ上で真空下で蒸発された。生成物は45mlの無水エタノールで溶解され、-20℃で結晶化された。純粋な長い針状物のオレイルメタンスルホネートが90%収率で入手された。

ステップ(b)：1, 2-O-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピルグリセロール

ラセミ3-(ジメチルアミノ)-1, 2-プロパンジオール (オールドリッチ・ケミカル (Aldrich Chemical)、ミルウォーキー (Milwaukee)、ウィスコンシン (Wisconsin))、1.5g、8.3mmole、および100ml

18mlのジメチルホルムアミド中のラセミ1, 2-O-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロピルグリセロール、2.1g (3.4mmole)、および4mlの2-プロモエタノール (オールドリッチ・ケミカル、ミルウォーキー、ウィスコンシン) が、100mlの丸底フラスコに添加され、45℃で36時間攪拌された。反応期間の終わりに、この混合物は減圧下で蒸発され、生成物はシリカゲルカラムを通過することによって精製された。この化合物は少量のクロロホルムに溶解され、1x18カラムに充填された30gmのシリカゲル60、70-270メッシュ上にチャージされた。純粋な化合物はクロロホルム中の8%メタノールで溶出され、上記系において展開されたシリカゲルGプレート上で0.21のRf値を与えた。最後に、臭化物質塩類は生成物をホワットマン (Whatman) DE-52セルロース (酢酸エステル形) カラムを通過させることによって酢酸エステルに変換された。生成物は50/50クロロホルム/メタノール溶出液中で入手された。化合物は-20℃でアセトニトリル中で結晶化された。

例2：DL-1, 2-O-ジパルミチル-3-ジメチルアミノプロピル-β-酢酸ヒドロキシエチルアンモニウム (DPR1 ジエーテル) の合成

この化合物は上記方法でパルミチルアルコールをオレイルアルコールと置換することによって合成された。

例3：DL-1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアミ

ノプロビル-β-群ヒドロキシエチルアンモニウム

21 ml の乾燥ジメチルホルムアミド中の 10 g の塩化オレオイルに対して、1.6 g の Rac-3-(ジメチルアミノ)-1,2-プロパンジオールおよび 5 ml のトリブチルが添加された。この混合物は 48 時間の間 60-65 °C に加熱された。この混合物が室温まで冷却された後、50 ml の蒸留されたばかりのジイソプロピルエーテルが添加され、この混合物は加熱沸騰された。この反応混合物は再び室温まで冷却され、濾過された。濾液は真空下で蒸発され、この生成物はアセトニトリルで結晶化された。純粋のジオレオイル-3-ジメチルアミノプロピルグリセロールが上の例 1 で説明されたようにジメチルホルムアミド中の 2-プロモエタノールでの処理によって四級化にさらに供された。

例 4: DL-1, 2-ジバリティル-3-ジメチルアミノプロビル-β-ヒドロキシエチルアンモニウム (DPR1 ジエステル)

この化合物は上記方法の塩化オレオイルの代わりに塩化バリティルを使用することによって合成された。

例 5: DL-1, 2-ジオレオイル-3-プロビル-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)

4 °C まで冷やされた、15 ml の蒸留されたばかりのクロロホルムおよび 10 ml の無水ピリジン中に溶解された 2.0 g の 3-(ジメチルアミノ)-1,2-プロパンジ

オール (1.0 mmol) は 0.7 mmol のバリティルメタンスルホネートと反応して、1-O-バリティル-2-トリゾ-3-ジメチルアミノプロピルグリセロールを得た。上記トリゾ化合物の無水オレイン酸でのアシル化はアルキル/アシル誘導体を与えた。

この化合物は上記方法で塩化オレオイルの代わりに塩化バリティルを使用することによって合成された。

例 7: 混合されたアシル/エーテル誘導体の合成

上記化合物の同一のまたは異なる脂肪酸残基を有するアルキル、アシルおよびアシル/アルキル誘導体の混合物は、出発材料の第一級およびまたは第二級アルコールをブロックするという既知の方法を使用することによって合成される。

たとえば、上記化合物の 1-アシル、2-アルキル類似体は、3-(ジメチルアミノ)-1,2-プロパンジオール (1.0 mmol) の第一ヒドロキシ基のベンジル化によって、0.9 mmol の塩化ベンジルと合成されて、バリティルまたはオレインメタンスルホネートと縮合して、1-O-アルキル、2-O-ベンジル-3-ジメチルアミノプロピルグリセロールを与えるトリゾ化合物を入手した。塩化バリティル酸での結果として生ずる化合物のアシル化が後に続く脱ベンジル化および上に説明されたのと類似の条件下での四級化は、必要とされる化合物を与えた。アルキル/アシル類似体の合成は 2 つのルートによって達成された。

(a) 3-(ジメチルアミノ)-1,2-プロパンジ

オールに対して、50 ml のクロロホルム中に溶解された 12.6 g の塩化オレオイルが 1 時間の期間にわたって 1 滴ずつ添加された。この反応物は一晩攪拌されたままにされ、それから 50 ml の冷水およびエーテルを添加することによって中止された。有機相は 0.5 N HCl および 0.5 N 重炭酸ナトリウムで 2 回洗浄され、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、真空下で蒸発された。この生成物は例 1 で述べられたようにケイ酸カラムクロマトグラフィーによって精製された。この純粋な化合物は以下のように塩化メチルで次に四級化され、つまり 500 mg の純粋な化合物が蛋白質加水分解管に添加され、塩化メチル (オールドリッチ・ケミカル、ミルウェアキー、ウィスコンシン) が、5 ml の塩化メチルで満たされるまで液体窒素中で管を反復冷却することによって管に凝縮された。この管は再び脱離され、冷凍され、かつオイルポンプで蒸発されて、任意の残余空気を除去した。最後にこの管は密封され、70 °C で維持された加熱された金属ブロックの中に 72 時間置かれた。反応期間の後、この管は 0 °C まで冷却され、それから未反応の塩化メチルを蒸発するために開けられた。黄色のワックスが -20 °C でアセトニトリルから結晶化された。化合物のさらなる精製がシリカゲル 60 カラム上で行なわれた。この純粋な化合物はクロロホルム中の 200 ml の 10% メタノールで溶出され、上記溶媒系で展開された場合、シリカゲル G プレート上で、23 の R<sub>F</sub> 値を与

オール (1.0 mmol) は 0.7 mmol のバリティルメタンスルホネートと反応して、1-O-バリティル-2-トリゾ-3-ジメチルアミノプロピルグリセロールを得た。上記トリゾ化合物の無水オレイン酸でのアシル化はアルキル/アシル誘導体を与えた。

(b) バチルアルコール (butyl alcohol) (セルダリ・リサーチ・ラボラトリー (Serdar Research Laboratory)) の第一級アルコール基は、t s - C l および Na l で保護され、第二ヒドロキシ基はそれから無水オレイン酸でアシル化されて、アルキル/アシルヨードヒドリン誘導体を得る。ジメチルアミンでのヨードヒドリン誘導体のさらなる処理は必要とされる生成物を与えた。これらの化合物は上に説明された方法を使用することによって四級化される。

例 8: 3,5-(N,N-ジブチル)-ジアミノベンゾイル-3-(DL-1,2-ジバリティル-ジメチルアミノプロビル-β-ヒドロキシエチルアミン) (DLYS-DABA-DPRI ジエステル)

ステップ 1: ジブチルオキシカルボニル-3,5-ジブチルアミノ安息香酸 (Bis-Boc-DABA)

大量の 3,5-ジブチルアミノ安息香酸 (1.52 g; 10 mmol)、トリエチルアミン (2.8 ml; 10 mmol) および二炭酸ジ-*t*-ブチル (4.5 g; 22 mmol) (オールドリッチ・ケミカル・カンパニー、ミルウェ

キー、W1)がDMF(10ml)に溶解され、室温で24時間攪拌された。この溶剤は真空下で蒸発され、生成物は溶離剤としてクロロホルムを使用してシリカゲル上でクロマトグラフィーにかけられ、標題の化合物を入手した。

ステップ2: Bis-Boc-DABA-DPRI ジエステル

Bis-Boc-DABA(3.52g、10mmol)およびDPRI(10mmol)が上の方法7.3および7.4に述べられた方法の後で結合された。

ステップ3: 3,5-(NN-ジリシル)-DABA-DPRI ジエステル

化合物#6(2mmol)はTFA(10ml)で30分間室温で処理され、BOC保護基を除去した。この溶剤を蒸発した後、生成物は縮合剤としてDCCを使用してBis-Boc-リシン(5mmol)と反応した。溶剤を蒸発した後分離された生成物はTFAを使用して脱保護され、上の7.4に述べられたように精製された。

例9: 3,5-(N,N-ジリシル)-ジアミノベンゾイル-グリシル-3-(DL-1,2-ジパルミトイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン)(DLYS-DABA-GLY-DPRI ジエステル)

ステップ1: ジ-1-ブチルオキシカルボニル-3,5-ジ-アミノ安息香酸(Bis-Boc-DABA)

上記の例7と同様。

L-1,2-ジパルミトイル-ジメチルアミノプロピル-β-ヒドロキシエチルアミン(SPC-DPRI ジエステル)の合成

公表された方法(ジェイ・ビー・ペイ他、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86、頁6982-6986、1989年)に従って調製されたL-5-カルボキシテトラブチルオキシカルボニルスペルミン(テトラ-BOC-Sper-COOH)(664mg:1mmol)が、8.3に述べられたようにDPRI(1mmol)に結合された。生成物は脱保護され、クロマトグラフィーによって精製されてSPC-DPRI ジエステルを調製した。

例11: リボソーム形成DOTAPの調製

陽イオンリボソーム形成材料1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)もまたエル、スタマティス他「バイオケミストリー」27:3917-3925(1988年)、またはエイチ・エイブル他「バイオフィジカル・ケミストリー」(Biophysical Chemistry)10:261-271(1979年)によって報告されたように調製される。

要約すると、スタマティス他は1mmolの3-ブromo-1,2-プロパンジオール(オールドリッチ、ミルウキー、W1)は、5mmolの乾燥ビリジンを含む乾燥したアルコールフリーのジエチルエーテル(20ml)

ステップ2: Boc-グリシル-DPRI ジエステル  
Boc-グリシン(1.75g、10mmol)およびDPRI(10mmol)が例8のステップ3および4に述べられた方法の後で結合された。

ステップ3: Bis-Boc-DABA-グリシル-DPRI ジエステル

上のステップ2からの化合物のBis-Boc-DABA(3.52g、10mmol)が、30分間室温でTFA(10ml)で処理され、Boc保護基を除去した。TFAは蒸発され、生成物は例8で述べられたように上記ステップ1からのBis-Boc-DABAと結合された。

ステップ4: 3,5-(NN-ジリシル)-DABA-グリシル-DPRI ジエステル

上記ステップ3からの化合物(2mmol)が30分間室温でTFA(10ml)で処理されて、BOC保護基を除去した。溶剤を蒸発した後、生成物は縮合剤としてDCCを使用してBis-Boc-リシン(5mmol)と反応した。溶剤を蒸発した後分離された生成物はTFAを使用して脱保護され、例8のステップ4に説明されるように精製された。

例8および9に説明されたDPRI誘導体に対応する様々なDORI誘導体は、結合方法でDORIを置換することによって合成される。

例10: レースベルミン-5-カルボキシル-3-(D

中の3mmolの塩化オレオイル(オレイン酸および塩化オキサリルから調製されたばかりの)で20℃で48時間アシル化された。ビリジニウム塩酸塩の沈殿物が濾過して取除かれ、濾液は真空下で濃縮され、10mlのヘキサンに再び溶解された。このヘキサン溶液は同量の1:1メタノール/0.1N HCOONa水溶液、pH3.0で3回、1:1メタノール/0.1N NaOH水溶液で3回、および1%NaCl水溶液で1回洗浄された。粗3-ブromo-1,2-ビス(オレオイルオキシ)プロパンは、それから25℃で乾燥ジメチルスルホキシド(30ml)中の15%トリメチルアミンの溶液で密封された管の中で72時間攪拌された。この反応の生成物はクロロホルム(200ml)に溶解され、それは1:1メタノール/100mM HCOONa水溶液、pH3.0で繰り返し洗浄され、真空内で蒸発されて薄い黄色のオイルを生成した。この材料はケイ酸(Bio-Sil Aビオラド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories))のカラム上で精製され、クロロホルム中の0-15%勾配のメタノールで溶出され、9-10%メタノールで純粋な形状の所望の生成物を与えた。

この精製された生成物は、50:15:5:5:2 CHCl<sub>3</sub>/アセトン/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH/Hで展開された薄層クロマトグラフィープレート(シリカゲルG)上の0.4のR<sub>f</sub>で移動する色のない粘性のあるオイ

ルであった。

#### 例12：脂質小囊調製

ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG) およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) が、アバンティ・ポーラ・リビッツ (Avanti Polar Lipid)、(ペルハム (Pelham)、アラバマ (Alabama)) から購入された。DOTMAはエプスタイン、ディー・他の米国特許第4,818,355号、またはフェルグナー・ビー・エル他のPNA S 84: 7413-7417 (1987年) に従って合成され、DOTAPは例10に従って合成された。DOPG/DOPC小囊は音波処理バイアルへの窒素ガスの流れの下で50mgのDOPGおよび50mgのDOPCを乾燥することによって調製された。このサンプルは一晚真空ポンプ上に置かれ、翌日脱イオン水を使って10mg/ml総脂質の濃度に水和された。このサンプルは倒立カップ (inverted cup) (浴型) プローブを備えるシステムモデル350音波処理機を最大設定で使用することによって、キャップされたバイアルの中で2時間音波処理され、この浴は15℃で循環された。代替的に、負に荷電された小囊は多重メラ小囊 (MLV) を生産するために音波処理なしで調製することもできるし、またはヌクレオア膜 (nucleo-pore membrane) を介するエクストルージョンによって、分離サイズの単一メラ小囊を生産することも可能

#### A：一般プロトコル：

例15-19に従うRNAのトランスフェクションは以下のように実行された。

密着近くで急速に分割する付着細胞のプレート (10cm)、または $1 \times 10^7$ の懸濁細胞が、そうでないと記されない限り以下のようにトランスフェクトされた。細胞はオプティ-MEM低減血清培地 (ジブコ) で一度洗浄され、それからオプティ-MEMで覆われたインキュベータに戻された。オプティ-MEM培地 (Opti-MEM Medium) のアリコート (Aliquots) (4ml) は12x75mmポリスチレンスナップキャップ管におかれ、50 $\mu$ gのリポフェクテン試薬が添加された。EcoRV線形にされたp1B131から転写されたキャップされたmRNAとキャップされない担体RNAとの混合物 (マローン・アール (Malone, E.) 他) のProc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 6077-6081 (1989年) による) が、それからRNAの総量20 $\mu$ gまで培地/脂質混合物に添加された。この混合物は直ちに攪拌された。細胞がインキュベータから除去され、培地が除去され、かつオプティ-MEM/脂質/RNA混合物が添加された。細胞はそれからそうでないと記されない限り8時間インキュベータに戻され、説明されるように取入れられた。

ネズミの線維芽細胞 (NIH 3T3、クローン2B) 細胞が、トランスフェクションの前にダルベッコ修飾イ

である。他の方法もまた利用可能であり、当業者に既知である。DOTMAまたはDOTAP小囊はまさに類似の装置で調製された。

#### 例13：ポリヌクレオチド/陽イオン脂質複合体形成

ポリヌクレオチド複合体は0.5mlの10 $\mu$ g/mlポリヌクレオチド溶液を40-100 $\mu$ g/mlで0.5mlの音波処理されたDOTMA/PEまたはDOTAP/PEリボソームと、一定の種やかな濃度を伴いながらシランジによってゆっくり添加することによって混ぜることによって調製された。希釈されたポリヌクレオチドおよびリボソーム溶液は、室温で濃縮された保存溶液からジブコ (Gibco) /BRL、ゲイゼルスベルグ (Gaithersburg)、メリーランド (Maryland) から入手されるオプティ-MEM低減血清培地 (Opti-MEM Reduced Serum Media) への希釈によって調製された。この方法は結果として組織培養の細胞にポリヌクレオチドを自発的に配達する正に荷電された複合体を生じる。正に荷電されたリボソームのポリヌクレオチドに対する異なった比率がこの要求に合うように使用され得る。これらの方法は本質的にフェルグナー・ビー・エル他のPNA S 84: 7413-7417 (1987年)、ならびにフェルグナー・ビーおよびエム・ホーム (M. Home) の「フォーカス」(Focus) 11 (2) 1989年春号において述べられるようなものである。

#### 例14：トランスフェクションプロトコル

グル培地 (Dulbecco's Modified Eagles Medium)、(DMEM) +10% (v/v) 仔ウシ血清 (CS) で維持された。

#### B：96-ウェルマイクロウェルプレート方法：

例20に従うRNAトランスフェクションおよび例20-23に従うDNAトランスフェクションは、96-ウェルプレートで以下のように行なわれた。

(1) 96-ウェルマイクロタイタプレート (ウェル) にはウェル当たり20000ないし40000の細胞がまかれた。

(2) 保存溶液からの陽イオン脂質調整物およびポリヌクレオチド調整物の希釈が、以下の表で述べられるスキームに従って2つの別個96-ウェルプレートにおける二次元連続希釈によって実行された。

(3) 脂質およびポリヌクレオチドの対応する希釈物が同量のポリヌクレオチドを対応する脂質マイクロウェルに移すことによって混合された。

(4) 血清含有培地は細胞を含むウェルから棄除された。

(5) 約100 $\mu$ lの量の陽イオン脂質/DNA複合体がマイクロタイタプレートの各ウェルで細胞に添加された。各ウェルの脂質およびポリヌクレオチドの最終希釈およびモル比は以下の表に示される。

(6) プレートは37℃ (5% CO<sub>2</sub>) でインキュベ

ートされた。トランスフェクション後4-24時間で、登録商標オブティメム (Opti-mem) 中の10%血清のアリコートが各ウェルに添加された。

(7) インキュベーションの終りに、細胞の検定培地または全細胞溶解産物が発現活性に対して検定された。

ベクター-ガラクトシダーゼがレポーター遺伝子であるところでは、発現は基板として2-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (ONPG) またはクロロフェニルレッド- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (CPRG) を使用して、405 nm でマイクロタイタリッドを使ってプレートを読んで、比色的にモニタされた。

#### 生体外のトランスフェクションプロトコル

##### 陽イオン脂質プレート

陽イオン脂質 (nmole/ml : uM)

マイクロタイタプレートにおける2X連続希釈

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
B	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
C	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
D	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
E	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
F	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
G	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23
H	672.34	336.07	168.04	84.04	41.97	21.06	10.46	5.23

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
B	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
C	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
D	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
E	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
F	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
G	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio
H	168.00 60.00 2.77	84.00 30.00 1.39	42.00 15.00 0.66	21.00 7.50 0.33	10.50 3.75 0.17	5.25 1.88 0.09	2.63 0.94 0.04	1.32 [Lipid] (uM) 0.48 [HA] (uM) 0.02 L/P ratio

ポリヌクレオチド (nmole/ml) : 平均ヌクレオチド

DMW=330 : 行ごとに2X連続希釈

脂質/ポリヌクレオチド混合物を細胞を含むプレートに添加

例15 : 血清抑制効果の証明

ルシフェラーゼRNA発現はますます高くなる濃度のウシ胎児血清が存在するところで、例14に述べられた方法

#### ポリヌクレオチドプレート

ポリヌクレオチド (nmole/ml : uM)

マイクロタイタプレートにおける2X連続希釈

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
B	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
C	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
D	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
E	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
F	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
G	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89
H	242.42	121.21	60.61	30.30	15.15	7.58	3.79	1.89

#### 混合プレート

(同量のポリヌクレオチドを脂質に移すことによる)

+/-血清

(opti-memまたはopti-sermを含む血清を添加することによる)

トランスフェクションの前の陽イオン脂質

およびポリヌクレオチドの最終濃度、

およびそのモル比

陽イオン脂質 (nmole/ml) : 列ごとに2X連続希釈

に従って、陽イオン脂質媒介トランスフェクション後の3T3細胞で決定された。トランスフェクション製剤は80% DOTMAおよび20% DOPEを含む脂質混合物におけるルシフェラーゼmRNA (HYCLONE) からなった。トランスフェクションを実行する際に、血清は脂質およびRNAを混ぜるのに先立って陽イオン脂質溶液およびRNA保存溶液の双方に添加された。

以下の表は図1のようにプロットされ、トランスフェクションに対する血清の著しい抑制効果を示す。

パーセント血清	ルシフェラーゼ活性
0	1716
5	71.1
10	47.0
15	35.6
20	29.9
対照	3.9

例16 : 血清抑制効果に対向するための2段階プロトコル

例15に述べられたものに続く実験において、この方法はDOTMA : DOPE 80 : 20が血清を添加する前にmRNA溶液と混ぜられることを除いては同一である。以下のデータおよび図2に示されるデータは低い血清濃度での著しいトランスフェクション増強効果を示す。図1および図2のy軸目盛の速いに注意されたい。

インキュベーション (分)	血清 : なし	5 %	15 %	20 %
0	1716	15465	6175	2497
5	2136	15285	2335	1368
10	1751	12436	4696	2294
20	1345	12116	3923	2133

例17 : 陽イオン脂質媒介トランスフェクションの最適化

合計で24の陽イオン脂質小囊製剤が陽イオン脂質種 (CL) としてDOTMAまたはDOTAPのいずれかを 使用して調整された。電荷密度の効果は、ジオレオイルホ スファチジルエタノールアミン (DOPE) またはジオレ オイルホスファチジルコリン (DOPC) のいずれであっ てもよい中性リン脂質に対する陽イオン脂質種のモル%を 増大させることによって評価された。各製剤は33モル% コレステロールを有する場合および有しない場合で調整さ れた。4つの異なるレベルの脂質、50、75、100、 および125μgが、5μgのルシフェラーゼメッセンジャー および15μgのリボソームRNAからなる合計20μgの固 定されたRNAレベルでテストされた。最適脂質濃度での ピークレベルを含む発現のレベルは以下に挙げられ、かつ 図3においてプロットされる。

	ルシフェラーゼ光単位
製剤 (CL:CLリン脂質 20%)	50% 80%

75、100、および125μgが、5μgのルシフェラ ーゼメッセンジャーおよび15μgのリボソームRNAから なる合計で20μgの固定されたRNAレベルでテストされ た。最適脂質濃度でのピークレベルを含む発現のレベルは 以下に挙げられ、かつ図4においてプロットされる。

このデータは100モル% DOTMAまたは70モル% DOTMAのいずれかおよび30モル%コレステロールか らなる製剤は、血清のないところで最高活性の原因となる ことを示す。以下のデータは血清のある場合の最良活性は コレステロールを含む製剤を伴って発生することを示す。 たとえば、製剤70/0/30において、100/0/0 における30%のDOTMAをコレステロールと置換する ことがコレステロールの存在のために活性の著しい増強を 示す。

型剤	合計	ルシフェラーゼ光単位	
DOTMA/PL/CHOL 脂質 (μg)	10%血清	オブティーマ	MEM
50/50/0	50	1217	544
	75	1309	176
	100	1047	56
	125	923	19
80/20/0	50	1510	450
	75	1347	215
	100	1469	81
	125	1046	55
100/0/0	50	208	2908
	75	53	939
	100	63	590
	125	50	196

DOPE	DOTMA	86	336	1268
	DOTAP	1	536	1666
	DOTMA : 30:70-87:3	127	1102	1568
	DOTAP : 30:70-87:3	2	71	184
DOPC	DOTMA	2	51	69
	DOTAP	2	3	51
	DOTMA : 30:70-87:3	48	522	581
	DOTAP : 30:70-87:3	6	88	256

これらのデータは最適活性にとって重要ないくつかの重 大な製剤問題を示す。

(1) CL小囊製剤中に中性リン脂質が含まれるとm RNAの機能し得る活性および発現を低減する。

(2) DOPCはDOPEより大きな抑制効果を有す る。

(3) DOTMA (ジエーテル化合物) はDOTAP (対応するジエステル化合物) より活性である。

(4) コレステロールはこれらの製剤において大きな 抑制効果を有しない。

例18 : 中性リン脂質を欠くトランスフェクション製剤 の有効性

例17のデータは増大する量の中性リン脂質 (DOPE またはDOPC) を含む製剤はますます活性がなくなるこ とを示したので、中性リン脂質成分を欠くいくつかの代替 の製剤がテストされた。4つの異なるレベルの脂質、50、

35/35/30	50 75 100 125	585 739 1491 1421	1714 543 740 160
56/14/30	50 75 100 125	1531 1251 1355 1007	675 1146 964 500
70/0/30	50 75 100 125	3786 891 323 185	2415 1674 784 347

例19 : 陽イオン脂質の構造トランスフェクション活性 陽イオン脂質によって示されるトランスフェクション活 性に対する様々な構造変更の効果を比較するために、DO TMA、DPTMA、DPR1ジエステルおよびDORI ジエステルを含む製剤が前の例で説明されたように調製さ れ、かつ例14Aで説明されたようにルシフェラーゼ酵素 をコードするRNAを有する組織培養細胞のトランスフェ クションにおいて使用された。DOTMAは登録商標リポ フェクティンで発見される陽イオン脂質である。しかしなが ら、この実験において、すべての脂質製剤は70モル%陽 イオン脂質および30モル%コレステロールで調製され、 この比率はここに使用されるDOTMA製剤を登録商標リ ポフェクティン試薬より3-4倍活性にさせるために示され る比率である。0.012から0.300μgの脂質の範 囲は、5μgのルシフェラーゼメッセンジャーおよび15μg のリボソームRNAを含む固定量のRNAをトランスフェ クトするために使用された。その結果は以下の表およびま た図5に示される。

μM 脂質	DORI	DOTMA	DPR	DPTMA
0.012	30	26	34	16
0.025	62	91	284	17
0.050	248	554	467	24
0.075	640	1555	404	36
0.100	1541	3901	160	53
0.125	2933	4462	272	65
0.150	5906	6368	413	114
0.175	9216	6772	899	145
0.200	12115	6757	1955	190
0.225	11705	6491	2124	216
0.250	10230	6372	2329	265
0.275	9885	5616	2339	336
0.300	7947	3651	1995	479

この類似体の相対活性はDORI > DOTMA > DPR  
I > DPTMAであることが示される。市販されているロー  
ゼンター抑制因子 (RI) がテストされ、非常に弱い  
活性を有することが発見された (データを示さず) が、し  
かしながらジバルミトイル誘導体 (DPR I ジエステル)  
はDOTMAの対応するジバルミトイル誘導体 (DPTM  
A) より数倍活性であった。この理由のためにローゼン  
ター抑制因子のジオレイル誘導体は合成され、それはD  
OTMAより活性であることが発見された。この分析に基  
づいて、DOTMA誘導体のRIに存在するヒドロキシ  
エチル部を伴う四級化は陽イオン脂質の活性をさらに改良  
するであろう。

このデータによって示される構造活性関係は、

#### (1) エーテル>エステル脂肪酸基結合

ンが、96-ウェルプレートの登録商標オブティム中で  
保存溶液 (DNA: 160 μg/ml; 脂質: 0.747  
mM) からの連続希釈物として調製され、対応する希釈物  
が一緒に混ぜられた。100 mlの量のDNA-脂質混合  
物が液体から分離吸引された約20000のCOS-7細  
胞を含む各マイクロタイタウェルに添加された。このプレ  
ートは4時間37℃ (5% CO<sub>2</sub>) でインキュベートされ、  
その時オブティム中の50 mlの30%ウシ血清が各ウ  
ェルに添加されて10%の血清濃度を生成した。37℃で  
さらに24時間インキュベートした後、登録商標オブティ  
ム中の100 mlの容量の10%ウシ血清が各ウェル  
に添加され、インキュベーションは37℃でさらに24時  
間続けられた。48時間後、トランスフェクション試薬は  
吸引され、50 μlの細胞溶解緩衝液 (250 mM トリス  
(Tris) 中の0.1%トリトン-X100、pH 8) が各  
ウェルに添加された。このプレートは-70℃で凍結され、  
-70℃と室温との間で3回の凍結融解サイクルにさらさ  
れた。50 μlの量のPBS (0.5% BSAを含む) が  
各ウェルに添加され、その後2 mg/mlの濃度で150  
μlのβ-ガラクトシダーゼ基質ONPGを添加した。4  
05 nmでの吸収度は標準曲線から読まれた。陽イオン脂  
質によって示されるトランスフェクション活性に対する様  
々な構造変更の効果を比較するために、DOTMA、DP  
TMA、DPR I ジエステルおよびDORI ジエステルを

#### (2) 不飽和>飽和脂肪酸基

#### (3) ヒドロキシエチル>メチル四級化基、である。

これらのデータはトランスフェクション活性に関して実  
質的に異なる陽イオン脂質が製造可能であり、かついくつ  
かの類似体はDOTMAより活性であることを示す。ここ  
に示され、かつ図5に示されるDOTMA製剤は市販の登  
録商標リポフェクションスタンダードよりはるかに活性であ  
ることに特に注目されたい。

例20: トランスフェクション製剤の有効性を増大する  
際のリソ脂質の効果

DOTMA/DOPE (登録商標リポフェクション) にお  
けるリソホスファチジルコリン (1-オレオイルリソホス  
ファチジルコリン) を含む脂質製剤の生体外トランスフェ  
クション効率は、COS-7細胞におけるpSV2-LacZプラスミドからのベータ-ガラクトシダーゼの遺伝子  
発現によって評価された。

#### トランスフェクションプロトコル:

20000細胞の固体群が、例14Aで示された多量の  
脂質およびDNAを使用してマイクロウェルプレートウェ  
ルにおいて、かつ血清のない場合にトランスフェクトされ  
た。

DNA (β-ガラクトシダーゼ: pSV2-LacZ)、  
登録商標リポフェクションのトランスフェクション脂質製剤、  
登録商標リポフェクション、およびリソホスファチジルコリ

含む製剤が前の例で説明されたように調製され、例14A  
で説明されたようにリソフェラーゼ酵素をコードするRN  
Aを有する組織培養細胞のトランスフェクションで使用さ  
れた。DOTMAは登録商標リポフェクションで発見される  
陽イオン脂質である。以下の4つの製剤がテストされた。

#### 組成物 モル比

DOTMA/DOPE/ リソPC	5/5/0 (1/1/0)
DOTMA/DOPE/ リソPC	5/5/1.25 (1/1/.25)
DOTMA/DOPE/ リソPC	5/3/2.5 (1/1/.5)
DOTMA/DOPE/ リソPC	5/3/5 (1/1/1)

結果:

実験結果は以下の表に要約される。データはβ-ガラ  
クトシダーゼのpg発現を示す。

#### DOTMA/DOPE/リソPC

1/1/0 (5/5/0)

#### 陽イオン脂質 (pモル)

DNA (pモル)	16000	8000	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	-54.9	221.7	778.7	1171.9	1096.8	667.2	433.8	233.4
3030	-63.2	32.9	351.1	1390.8	1173.7	776.1	384.3	167.3
1515	-67.1	-69.3	69.4	934.8	1263.1	738.0	346.9	168.1
758	-64.2	-69.7	-23.0	919.4	437.8	635.5	232.8	130.8
379	-73.0	-92.2	-45.9	265.8	161.0	508.7	214.4	140.6
189	-73.6	-49.7	-57.8	133.3	38.3	177.8	232.0	174.4
95	-76.0	-73.4	-37.3	18.3	30.0	68.1	87.3	132.0
47	-72.6	-69.2	-34.6	-20.9	8.8	27.0	88.1	81.

#### DOTMA/DOPE/リソPC

1/1/0.25 (5/5/1.25)

陽イオン脂質 (pモル)

DNA(pモル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	-111.7	-22.4	1039.5	1878.2	1821.4	1202.0	645.7	160.0
3030	-122.8	-66.9	344.0	1802.3	2102.1	1638.6	693.3	611.0
1515	-136.1	-122.9	-129.2	787.4	1801.4	1565.3	711.8	371.7
758	-128.5	-111.7	-103.2	519.7	206.0	1398.5	793.0	648.2
379	-122.9	-123.7	-117.3	230.0	640.1	611.0	711.8	196.4
189	-142.3	-145.4	-131.3	89.8	188.0	212.2	314.0	120.4
95	-125.7	-152.8	-129.5	-47.3	78.7	426.1	179.6	126.4
47.4	-139.7	-145.6	-103.3	-44.1	358.9	123.6	78.7	89.9

DOTMA/DOPE/リゾPC

1/1/0.5 (5/5/2.5)

陽イオン脂質 (pモル)

DNA(pモル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	-10.2	33.4	646.6	237.4	355.8	785.0	393.0	269.9
3030	-53.8	6.6	211.0	1025.8	374.6	613.4	394.6	292.4
1515	-36.2	-36.2	281.8	772.2	872.0	672.6	679.8	281.2
758	-65.4	-55.4	121.8	505.0	778.2	1186.2	667.8	371.0
379	-68.2	-71.8	32.1	320.2	153.4	54.4	1001.2	323.0
189	-69.0	-73.0	-23.0	179.0	478.2	223.8	373.4	284.2
95	-71.0	-73.0	-42.6	66.6	55.4	157.8	219.4	84.6
47.4	-70.6	-70.6	-21.6	33.0	59.4	61.8	73.8	75.8

DOTMA/DOPE/リゾPC

1/1/1 (5/5/5)

陽イオン脂質 (pモル)

して優れたトランスフェクション活性を示す。エステル結合体を有する陽イオン脂質とエーテル結合体を有する陽イオン脂質 (DORIEと比較されたDORI) との間には有効性において何ら重要な差は見られなかった。しかしながら、四級アンモニウムの塩基に結合されたヒドロキシエチル部 (DORIおよびDORIE) は、DOTMAのメチル基と比較して活性を改良するように見える。

DOTMA/DOPE (5/5)

陽イオン脂質 (pモル)

DNA(pモル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	-200.0	326.1	1764.1	1450.3	571.2	377.2	22.2	-30.3
3030	-291.9	-322.7	1012.4	764.4	589.2	138.9	28.8	-23.3
1515	-306.6	48.4	702.0	388.0	499.3	215.0	38.2	48.4
758	-275.2	-186.9	377.6	395.0	293.3	110.5	43.1	28.8
379	-217.6	-262.1	128.3	221.6	286.9	123.5	45.1	45.1
189	-224.2	-294.8	28.8	179.1	139.9	-64.0	68.0	19.0
95	-227.5	-298.0	-141.2	205.2	130.1	136.4	19.0	-0.7
47.4	-213.1	-324.3	-26.8	126.8	-26.8	126.8	-13.7	28.4

DORI/DOPE (5/5)

陽イオン脂質 (pモル)

DNA(pモル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	1321.4	1289.1	2111.7	1611.7	986.0	446.5	281.1	87.5
3030	853.8	1289.1	1918.5	1359.3	1079.4	302.8	221.4	293.2
1515	904.0	1781.0	1775.0	1794.6	880.2	225.8	184.3	179.9
758	563.5	706.5	835.5	1251.0	789.4	618.1	248.8	220.6
379	410.1	842.3	139.9	329.4	415.0	356.9	309.3	197.2
189	-190.7	510.9	180.2	139.9	277.0	87.5	111.7	14.9
95	-190.8	-37.3	107.7	91.5	43.5	252.8	14.9	152.0
47.4	-279.4	-33.5	144.0	35.1	35.1	107.7	87.5	27.0

DNA(pモル) 16800 8400 4200 2100 1050 525 262.5 131

6060	33.4	198.0	381.7	136.0	64.7	9.0	93.3	131.1
3030	-47.2	98.7	341.4	732.8	114.9	67.5	230.9	187.2
1515	-59.4	64.9	267.9	652.8	648.3	50.3	115.3	170.2
758	-65.7	-30.9	199.9	537.8	715.3	169.8	130.2	206.6
379	-62.6	-29.5	110.2	446.7	275.0	546.5	219.4	371.8
189	-72.8	-51.1	18.2	304.2	199.5	353.3	485.3	275.0
95	-76.0	-63.7	-15.6	123.4	148.7	186.5	150.4	218.1
47.4	-72.2	-57.8	-32.1	77.0	95.1	49.4	133.2	143.4

DOTMA/DOPEにリゾPC (モノオレイルPC) が含まれると、セル比が適切である場合にはトランスフェクション効率を高める。

1/1/0.25 (または5/5/1.25) でのDOTMA/DOPE/リゾPCは最適であるように見える。

各陽イオン脂質製剤の詳細なトランスフェクション効率は図6a-6dの三次元プロットにおいて示される。

例21: 陽イオン脂質類似体の比較トランスフェクション効率

DOTMA/DOPE 5/5, DORI/DOPE 5/5, およびDORIE/DOPE 5/5を含む陽イオン脂質製剤が、例14Bの方法に従ってウェル当たり40000細胞の密度でCOS-7細胞をトランスフェクトするために使用された。図 および以下の表で示されるように、DORIおよびDORIE類似体はDOTMAと比較

DORIE/DOPE (5/5)

陽イオン脂質 (pモル)

DNA(pモル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	-47.3	1134.1	2040.3	1682.7	1352.6	615.3	82.4	298.3
3030	-209.7	1349.4	1752.2	1934.3	981.3	388.8	164.0	61.2
1515	-176.9	293.8	1904.8	2123.7	1321.6	387.6	328.5	104.2
758	-178.4	131.5	700.1	1175.8	1526.5	316.0	170.2	68.1
379	-174.9	-40.3	179.2	196.4	455.5	339.0	193.1	-13.3
189	-243.2	-147.2	-39.5	-29.1	325.1	134.1	50.8	-6.8
95	-147.2	-109.3	-112.4	144.8	-4.8	248.0	71.5	-48.5
47.4	-108.0	-251.3	-68.9	249.5	-60.3	-66.5	-63.8	-39.1

例22: トランスフェクション製剤における中性脂質のトランスフェクションの効率に対する効果

A. 中性リン脂質

増大する濃度のジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) がDORIに添加され、この脂質製剤は例14Bの方法に従ってpSV2-lacZを使ってCOS-7細胞を20000細胞/ウェルの密度でトランスフェクトするために使用された。この製剤は図8および以下の表に示されるようにβ-ガラクトシダーゼ活性の発現によってその比較トランスフェクト効率について評価された。

DORI/DOPE (10/0)

陽イオン脂質 (pモル)

DNA(p モル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	240.8	496.3	953.3	958.7	193.4	88.3	33.3	22.5
3030	-43.4	600.6	1389.4	954.6	239.3	133.8	44.2	22.5
1515	-109.0	132.1	847.4	898.2	233.8	19.7	39.9	50.0
758	-123.4	-85.8	374.4	229.2	323.1	112.1	134.9	24.0
379	-101.7	-81.5	64.2	96.2	219.1	130.9	39.4	31.2
189	-128.3	-94.3	-6.4	65.7	139.6	133.8	19.8	31.2
95	-100.3	-101.7	-35.3	73.1	52.9	64.2	4.4	6.6
47	-113.1	-114.7	-15.0	-38.2	13.3	-4.9	-6.4	5.2

#### DORI/DOPE (8/2)

陽イオン脂質 (p モル)

DNA(p モル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	51.2	202.8	218.0	144.8	84.7	77.4	46.1	19.9
3030	107.3	287.1	98.4	81.1	167.3	53.0	49.3	47.4
1515	30.6	429.4	139.2	109.2	39.9	62.4	45.5	72.4
758	51.2	408.8	243.9	313.3	103.5	60.5	10.6	47.4
379	79.3	186.4	171.0	195.4	75.5	235.1	86.7	44.3
189	28.7	3.1	36.2	182.2	64.3	38.1	75.5	107.6
95	-44.2	-20.0	0.6	50.4	-28.4	22.2	31.2	6.2
47	13.7	24.9	-38.7	30.4	-14.7	-25.6	14.3	-3.1

#### DORI/DOPE (5/5)

陽イオン脂質 (p モル)

ORI/DOPEを使用してトランスフェクトされた。この製剤は図9および以下の表に示されるようにβ-ガラクトシダーゼ活性の発現による比較トランスフェクト効率について評価された。

#### DORI/CHOL (10/0)

陽イオン脂質 (p モル)

DNA(p モル)	16.8	8.4	4.2	2.1	1.05	0.53	0.26	0.13
6.06	864.2	622.2	1243.8	667.6	114.4	166.1	13.2	69.3
3.03	721.5	1121.5	1527.9	703.7	101.1	-39.0	-74.2	91.0
1.52	173.8	1073.1	939.4	579.6	194.1	12.0	38.7	89.7
0.76	-30.1	686.6	413.2	162.3	148.3	17.3	-9.3	-27.3
0.38	-43.4	180.1	337.9	175.0	124.4	17.1	47.5	19.6
0.19	-70.8	40.0	130.4	202.8	934.8	-33.9	23.4	19.6
0.095	-51.7	-39.0	55.3	54.0	343.5	-3.3	-71.6	-18.8
0.047	-109.0	-75.9	20.9	10.7	186.5	15.8	21.4	-37.7

#### DORI/CHOL (7/3)

陽イオン脂質 (p モル)

DNA(p モル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	669.0	1445.1	1810.3	689.3	59.4	8.0	0.0	0.0
3030	5.3	1232.5	1784.4	723.3	89.9	0.0	0.0	0.0
1515	0.0	416.2	1437.9	728.4	131.2	0.0	0.0	0.0
758	0.0	164.1	1047.1	347.8	147.2	0.0	0.0	0.0
379	0.0	0.0	319.3	342.4	101.3	0.0	0.0	0.0
189	0.0	0.0	71.3	138.4	392.4	0.0	0.0	0.0
95	0.0	0.0	32.1	0.0	117.0	0.0	0.0	0.0
47	0.0	0.0	0.0	0.0	64.2	0.0	0.0	0.0

#### DORI/DOPE (5/5)

陽イオン脂質 (p モル)

DNA(p モル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	341.3	876.8	1093.7	1543.8	1470.2	854.8	318.7	334.4
3030	-43.2	640.6	819.7	1497.0	1640.8	904.4	490.3	435.1
1515	-103.0	378.3	1079.6	1890.0	1189.2	741.1	505.2	232.6
758	-111.7	182.4	372.2	1478.6	1515.4	837.5	591.0	247.8
379	-110.0	-3.0	336.5	764.2	744.9	984.7	667.6	239.3
189	-106.7	-61.3	134.1	364.6	293.0	384.9	349.9	192.6
95	-105.0	-63.2	62.1	133.9	130.8	219.4	289.6	276.3
47	-119.0	-32.0	-11.4	150.8	77.3	122.4	67.2	33.3

#### DCRI/DOPE (2/8)

陽イオン脂質 (p モル)

DNA(p モル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	235.3	1102.5	1307.2	742.2	564.4	166.3	31.8	52.5
3030	-69.0	788.7	1821.5	1274.8	423.2	149.6	68.0	38.7
1515	-107.8	18.0	1678.4	1407.7	749.1	180.4	88.7	111.1
758	-123.1	-94.8	204.0	737.0	480.1	206.0	95.4	62.9
379	-123.3	-83.7	68.0	497.3	249.6	193.9	64.3	52.5
189	-123.1	-65.8	-61.3	347.3	169.8	130.1	95.6	50.0
95	-123.1	-119.2	-95.8	137.0	73.2	32.3	43.6	9.4
47	-128.3	-123.3	-82.0	-14.7	229.4	24.9	62.9	21.3

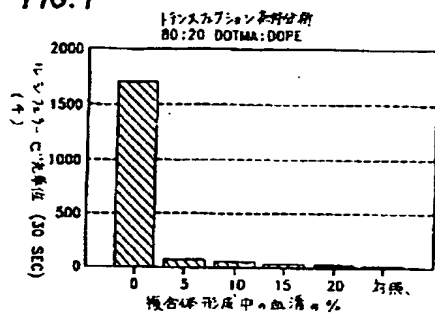
#### B: コレステロール

コレステロール (CHOL) がDORI/CHOL 7/3のモル比でDORIに添加され、この脂質製剤は例14Bの方法に従ってpSV2-lacZを使ってCOS-7細胞を40000細胞/ウェルの密度でトランスフェクトするために使用された。同一の細胞が比較値のためにD

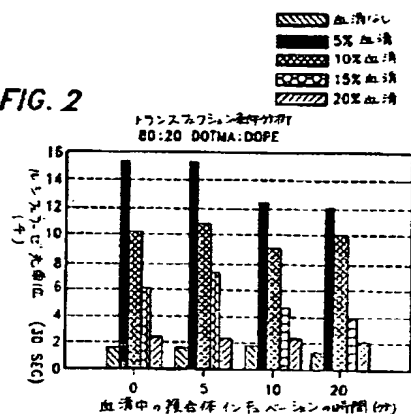
DNA(p モル)	16800	8400	4200	2100	1050	525	262.5	131
6060	396.9	1838.9	2010.3	1917.0	1283.9	643.3	273.8	0.6
3030	182.4	1914.2	1936.8	1921.2	963.2	285.4	271.1	30.3
1515	108.4	1624.0	1446.9	1775.4	1109.4	462.3	91.2	34.9
758	11.9	398.3	722.9	1064.3	1432.4	214.7	99.7	22.8
379	-19.3	441.1	383.8	837.7	1077.1	648.4	237.1	20.4
189	-88.0	143.0	358.1	323.4	382.7	391.3	85.6	130.7
95	-151.0	60.2	78.5	21.8	110.2	34.4	33.1	170.3
47	-173.7	-26.3	10.5	-34.8	292.4	79.9	11.9	-67.4

当業者に明らかな、開示されたこの発明の様々な修正、改良および応用があり、この発明はかかる実施例をカバーすることが意図される。この発明をある好ましい実施例の面で説明してきたが、開示の全範囲は以下の請求の範囲を参照して判断されるものとする。

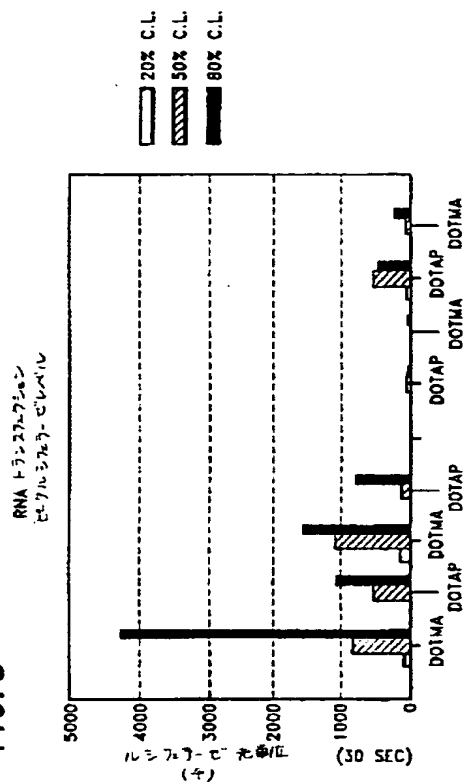
**FIG. 1**



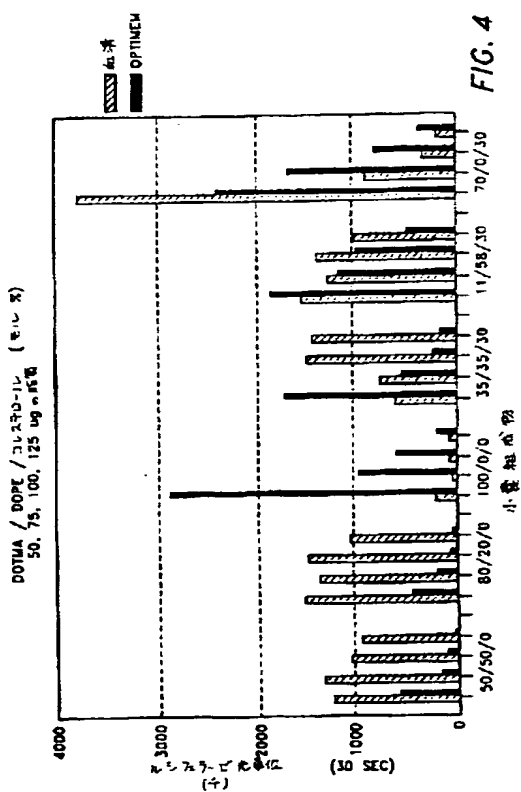
**FIG. 2**



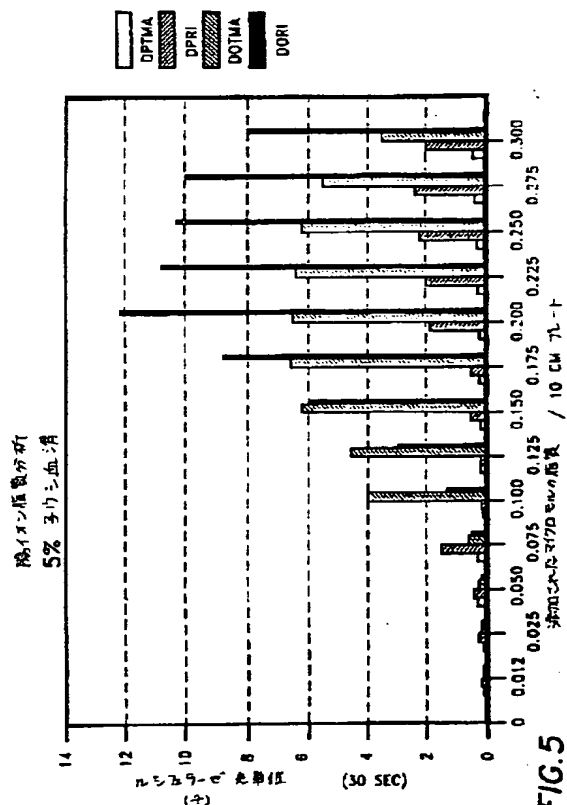
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



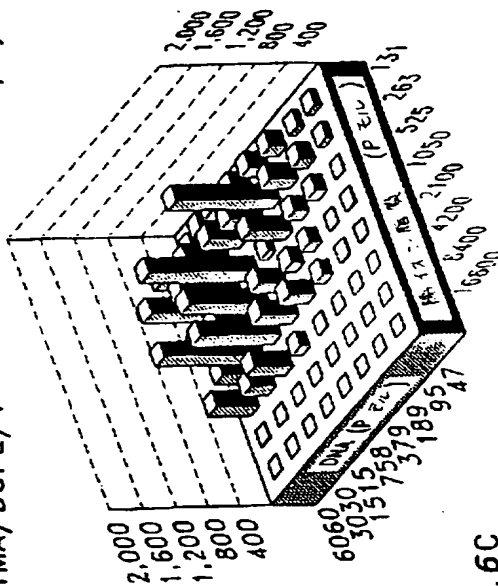
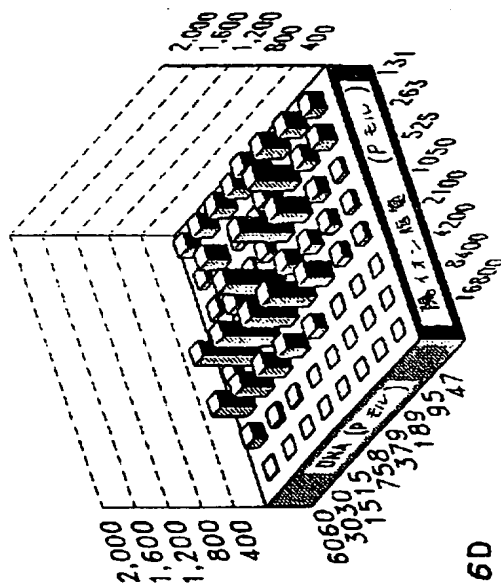
DOTMA/DOPE/1- $\beta$ -D-glucopyranoside - "1,2" - PC 5/5/2.5

FIG. 6C

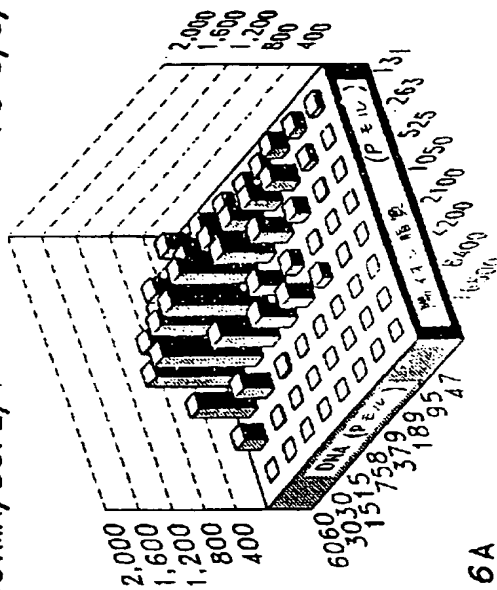
BETA-GAL PG 450 (35.7) L. n. pSV2-lacZ.

DOTMA/DOPE/1- $\beta$ -トコフェロール-リゾ"-PC 5/5/5

**FIG. 6D**

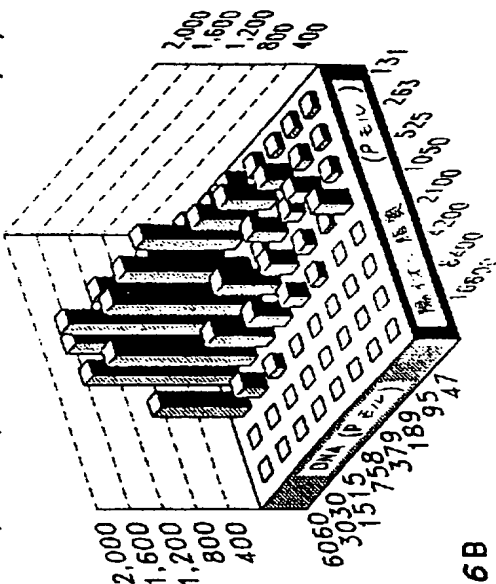
BETA-GAL 0 PJ 發現: COS. 7 L. 0 psv2 - lacZ -

DOTMA/DOPE/1-オレフィン - リゾ - PC 5/5/0



**FIG. 6A**

PETA - GAL O PG de R.: CND.7 E. O P SVZ - la. Z.

DOTMA/DOPE/1- $\beta$ -ナリイル-3- $\beta$ -ナリイル-5- $\beta$ -ナリイル-PC 5/5/1.25

**FIG. 6B**

BETA-GAL 表达: (15.7 L) pSV2-lacZ

DORIE.AC/DOPE 5/5

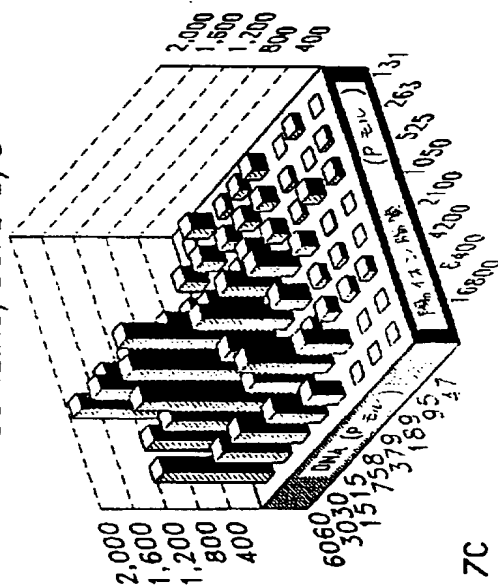


FIG. 7C

パターンの表示は、図 7C のように表示される。(6-20-90)

DORI/DOPE 10/0

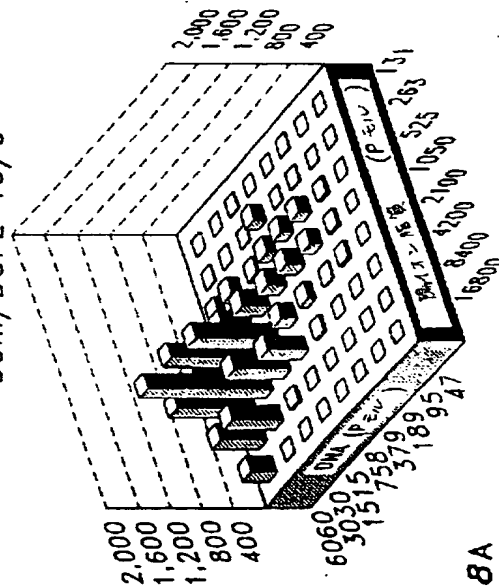


FIG. 8A

パターンの表示は、図 8A のように表示される。(6-20-90)

DOTMA/DOPE 5/5, (BRL)

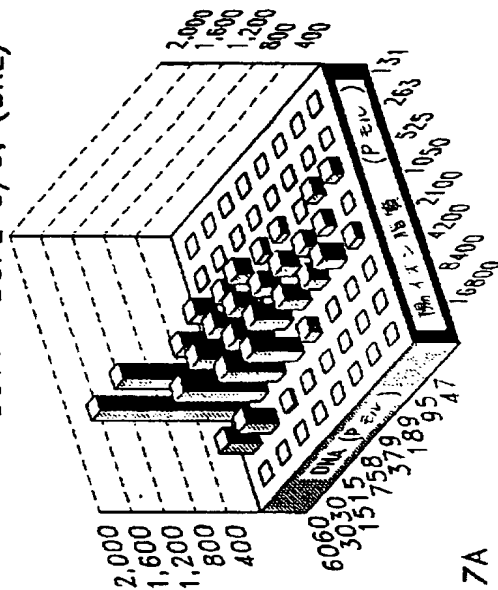


FIG. 7A

パターンの表示は、図 7A のように表示される。(6-20-90)

DORI.AC/DOPE 5/5

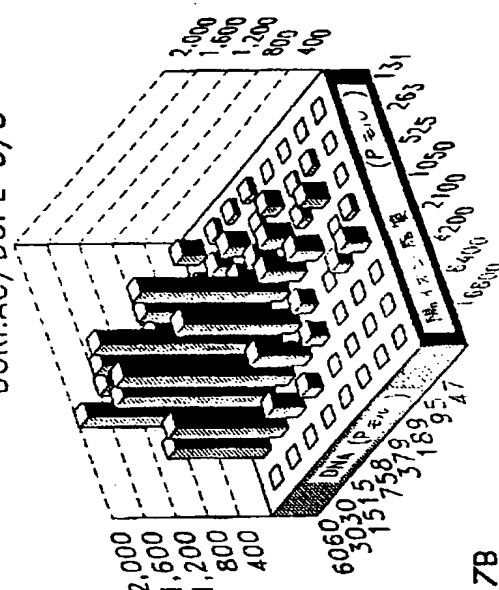
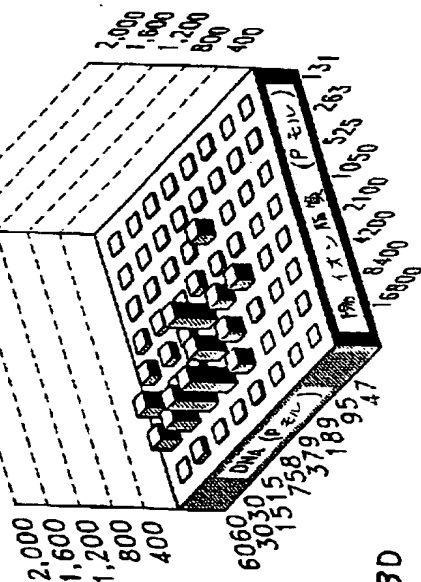
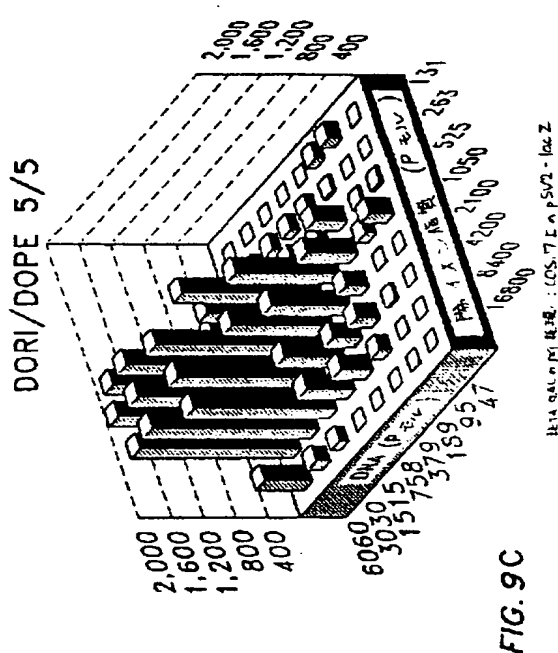
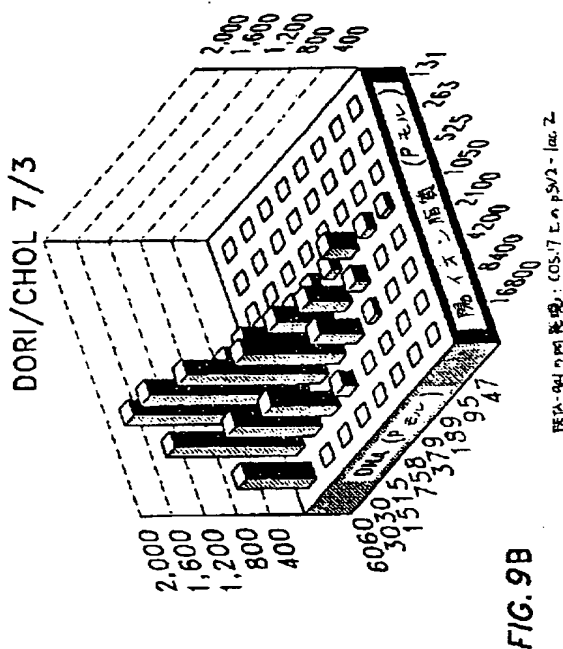


FIG. 7B

パターンの表示は、図 7B のように表示される。(6-20-90)

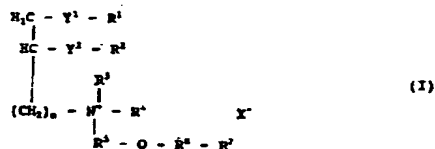
DORI/DOPE 2/8





# 要約書

治療ポリヌクレオチド、抗ウイルス性薬剤の配運および免疫原ペプチドの導入による細胞のトランスフェクションを含む生物学的活性剤の細胞への輸送を容易にすることが可能な陽イオン脂質が開示される。この陽イオン脂質はアンモニウム基を含み、一般構造 (I) を有する。トランスフェクトまたは輸送能力を高める付加的な陽イオン部位を含むこれらの化合物の添加物もまた開示される。構造活性相関関係はこの目的のために合成されるべき好ましい化合物の選択を提供する。これらの陽イオン脂質の用途のために開示される組成物は、生体外トランスフェクションのための製剤ならびに治療剤の経管外および局所的投与のための製剤製剤を含む。



## 国際調査報告

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Publication No. PCT/US91/02691
IPC(5): A61K 13/00 US Cl.: A24/422		
2. FIELD OF INVENTION		
3. SUMMARY OF THE INVENTION		
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS		
5. REFERENCE TO OTHER PUBLICATIONS		
6. STATEMENT OF THE INVENTOR		
7. STATEMENT OF THE INVENTOR		
8. STATEMENT OF THE INVENTOR		
9. STATEMENT OF THE INVENTOR		
10. STATEMENT OF THE INVENTOR		
11. STATEMENT OF THE INVENTOR		
12. STATEMENT OF THE INVENTOR		
13. STATEMENT OF THE INVENTOR		
14. STATEMENT OF THE INVENTOR		
15. STATEMENT OF THE INVENTOR		
16. STATEMENT OF THE INVENTOR		
17. STATEMENT OF THE INVENTOR		
18. STATEMENT OF THE INVENTOR		
19. STATEMENT OF THE INVENTOR		
20. STATEMENT OF THE INVENTOR		
21. STATEMENT OF THE INVENTOR		
22. STATEMENT OF THE INVENTOR		
23. STATEMENT OF THE INVENTOR		
24. STATEMENT OF THE INVENTOR		
25. STATEMENT OF THE INVENTOR		
26. STATEMENT OF THE INVENTOR		
27. STATEMENT OF THE INVENTOR		
28. STATEMENT OF THE INVENTOR		
29. STATEMENT OF THE INVENTOR		
30. STATEMENT OF THE INVENTOR		
31. STATEMENT OF THE INVENTOR		
32. STATEMENT OF THE INVENTOR		
33. STATEMENT OF THE INVENTOR		
34. STATEMENT OF THE INVENTOR		
35. STATEMENT OF THE INVENTOR		
36. STATEMENT OF THE INVENTOR		
37. STATEMENT OF THE INVENTOR		
38. STATEMENT OF THE INVENTOR		
39. STATEMENT OF THE INVENTOR		
40. STATEMENT OF THE INVENTOR		
41. STATEMENT OF THE INVENTOR		
42. STATEMENT OF THE INVENTOR		
43. STATEMENT OF THE INVENTOR		
44. STATEMENT OF THE INVENTOR		
45. STATEMENT OF THE INVENTOR		
46. STATEMENT OF THE INVENTOR		
47. STATEMENT OF THE INVENTOR		
48. STATEMENT OF THE INVENTOR		
49. STATEMENT OF THE INVENTOR		
50. STATEMENT OF THE INVENTOR		
51. STATEMENT OF THE INVENTOR		
52. STATEMENT OF THE INVENTOR		
53. STATEMENT OF THE INVENTOR		
54. STATEMENT OF THE INVENTOR		
55. STATEMENT OF THE INVENTOR		
56. STATEMENT OF THE INVENTOR		
57. STATEMENT OF THE INVENTOR		
58. STATEMENT OF THE INVENTOR		
59. STATEMENT OF THE INVENTOR		
60. STATEMENT OF THE INVENTOR		
61. STATEMENT OF THE INVENTOR		
62. STATEMENT OF THE INVENTOR		
63. STATEMENT OF THE INVENTOR		
64. STATEMENT OF THE INVENTOR		
65. STATEMENT OF THE INVENTOR		
66. STATEMENT OF THE INVENTOR		
67. STATEMENT OF THE INVENTOR		
68. STATEMENT OF THE INVENTOR		
69. STATEMENT OF THE INVENTOR		
70. STATEMENT OF THE INVENTOR		
71. STATEMENT OF THE INVENTOR		
72. STATEMENT OF THE INVENTOR		
73. STATEMENT OF THE INVENTOR		
74. STATEMENT OF THE INVENTOR		
75. STATEMENT OF THE INVENTOR		
76. STATEMENT OF THE INVENTOR		
77. STATEMENT OF THE INVENTOR		
78. STATEMENT OF THE INVENTOR		
79. STATEMENT OF THE INVENTOR		
80. STATEMENT OF THE INVENTOR		
81. STATEMENT OF THE INVENTOR		
82. STATEMENT OF THE INVENTOR		
83. STATEMENT OF THE INVENTOR		
84. STATEMENT OF THE INVENTOR		
85. STATEMENT OF THE INVENTOR		
86. STATEMENT OF THE INVENTOR		
87. STATEMENT OF THE INVENTOR		
88. STATEMENT OF THE INVENTOR		
89. STATEMENT OF THE INVENTOR		
90. STATEMENT OF THE INVENTOR		
91. STATEMENT OF THE INVENTOR		
92. STATEMENT OF THE INVENTOR		
93. STATEMENT OF THE INVENTOR		
94. STATEMENT OF THE INVENTOR		
95. STATEMENT OF THE INVENTOR		
96. STATEMENT OF THE INVENTOR		
97. STATEMENT OF THE INVENTOR		
98. STATEMENT OF THE INVENTOR		
99. STATEMENT OF THE INVENTOR		
100. STATEMENT OF THE INVENTOR		

第1頁の続き

⑨Int. Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

A 01 K 48/00

8314-4C

優先権主張 ⑩1990年8月7日⑩米国(U S)⑩563,444

⑩1991年4月16日⑩米国(U S)⑩686,746

⑫発明者	クマール, ラージュ	アメリカ合衆国、92129 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、ソートウース・ウェイ、9338
⑫発明者	バサバ, チャンナ	アメリカ合衆国、92130 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、バリング・ポイント、4619
⑫発明者	ボーダー, リチャード・シイ	アメリカ合衆国、92064 カリフォルニア州、ボーウェイ、ロビンソン・ブルバード、12730
⑫発明者	ハン・フェルグナー, ジン・ユ	アメリカ合衆国、92067 カリフォルニア州、ランチョ・サンタ・フェ、ラス・パロマス、5412